

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLE DU
FACTEUR INHIBITEUR DE LA MIGRATION DES MACROPHAGES DANS LA
MODULATION DE LA RÉPONSE IMMUNE CELLULAIRE
PRECOCE ET TARDIVE DURANT L'INFECTION PAR *PLASMODIUM*

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
TSHIKUDI MALU DIANE

FÉVRIER 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le Docteur Tatiana Scorza pour la chance qu'elle m'a donnée de faire ma maîtrise avec elle et ainsi avoir le privilège de travailler sur un sujet qui m'a fortement passionnée pendant ces deux ans. Je voudrais aussi la remercier pour sa supervision bien appréciée tout au long de cette étude. Je n'oublie pas de remercier Mathieu Cambos et Jaime Sanchez pour leurs précieux conseils qui m'ont évité de joyeux maux de tête. Pour terminer, j'aimerais aussi remercier François Desautels ainsi que tous les stagiaires, Charlotte, Hugo, Johara, Karine et Véronique pour l'aide offerte qui m'a permis d'avancer dans mon projet et aussi, pour les blagues et discussions que nous avons partagées au laboratoire.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	V
LISTE DES FIGURES	VIII
RÉSUMÉ	XI
INTRODUCTION.....	1
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	4
1.1 La malaria.....	4
1.2 Modèles murins de malaria	6
1.3 Implication de la rate dans le contrôle de la parasitémie.....	10
1.4 Système immunitaire inné	11
1.5 Interféron gamma (IFN- γ).....	13
1.6 Les macrophages	16
1.7 Oxyde nitrique (NO)	18
1.8 Le Facteur de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor, TNF).....	19
1.9 L'Interleukine 12 (IL-12).....	22
1.10 La réponse immunitaire adaptative lors de l'infection par <i>Plasmodium</i>	23
1.11 Les lymphocytes T et les récepteurs Tolls	26
1.12 Implication du facteur inhibiteur de la migration de macrophages (MIF) dans l'immunité innée et adaptative.....	31
1.13 HYPOTHESE ET OBJECTIFS	36
DÉMARCHE ET MÉTHODOLOGIE	38
2.1 Souris BALB/c	38

2.2 Infection des souris BALB/c par <i>P. chabaudi adami</i>	38
2.3 Préparation des cellules de la rate.....	39
2.4 Détermination de la cinétique d'infection	39
2.5 Dosage de l'hémoglobine.....	40
2.6 Détermination des réticulocytes sanguins.	40
2.7 Marquage de la série de précurseurs érythroïdes.....	41
2.8 Détermination de l'expression de TLR2 et 4.....	41
2.9 Analyses statistiques.....	42
DESCRIPTION DE L'IMPLICATION DE L'ÉTUDIANTE DANS LES TRAVAUX ET LA RÉDACTION DE L'ARTICLE.....	43
RÉSULTATS	44
 3. ARTICLE: MIF: a down-modulator of early T cell-dependent IFN γ responses in <i>Plasmodium</i> <i>chabaudi adami</i> (DK) infected mice.	44
3.1 Abstract.....	44
3.2 Introduction	45
3.3 Material and Methods.....	48
3.3.1 Parasite, mice and infection	48
3.3.2 Cell purification and culture.....	48
3.3.3 Quantification of activated CD4 ⁺ T cells and IFN- γ , TNF α , IL-4 and IL-10.....	49
3.3.4 Estimation of T-bet and GATA3 expression by RT-PCR.....	49
3.3.5 CFSE labeling of CD4 ⁺ T cells	50
3.3.6 Measurement of CD4 ⁺ T cell proliferation.....	50
3.3.7 Detection of MIF and transcriptional factors expression by Western Blot	51
3.3.8 Statistical analysis.....	52
3.4 Results	52
3.4.1 Parasitemia is significantly decreased in MIF KO BALB/c mice infected with <i>P.c. adami</i> DK	

parasites and associated to enhanced IFN γ responses and decreased IL-10 and IL-4 responses.	52
3.5.2 MIF KO CD4 ⁺ T cells have increased capacity to proliferate and secrete more IFN- γ and less IL-4 in vitro.....	54
3.5. Discussion.....	55
3.6 References	67
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	74
4.1 Effet de l'absence de MIF sur la concentration d'hémoglobine pendant l'infection létale et non létale avec <i>P. c. adami</i>	74
4.2 Effet de l'absence de MIF sur la réticulocytose.	77
4.3 Les souris MIF/KO ont une faible expression constitutive des récepteurs TLR2 et TLR4 chez les lymphocytes T et les macrophages.	80
DISCUSSION	85
OUVERTURE SUR LE PROJET	95
BIBLIOGRAPHIE	96

LISTE DES ABRÉVIATIONS

MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
TNF- α	Tumour necrosis factor alpha
IL-12	Interleukin-12
Th-2	T helper-2
Th-1	T helper-1
IFN- γ	Interferon gamma
MIF/KO	MIF Knock out (Souris déficientes en MIF)
<i>P.C. adami</i>	<i>Plasmodium chabaudi adami</i>
TLR4	Toll-like receptor 4
TLR2	Toll-like receptor 2
WT	Wild type
CFU-S	Colony-Forming Units-Spleen
LPS	Lipopolysaccharide
NO	Oxyde nitrique
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IL-10	Interleukin-10
CD90+	Cluster of differentiation 90 positive
PFCRT	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein 1

HGF	Hepatocyte growth factor
MET	(MNNG(N-Methyl-N'-nitro-Nnitroso-guanifine)HOS Transforming gene
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
T $\gamma\delta$	Lymphocytes gamma-delta
NK	Natural killer
ASGM1	AsialoGM1
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
NCR	Natural cytotoxicity receptor
CTL	Cytotoxic T Lymphocytes
TGF- β	Transforming growth factor beta
IFNGR1	Interferon-gamma receptor 1
Jak	Janus kinase
Stat1	Signal transducers and activators of transcription
SH2	Src homology domain
GAS	Gamma interferon activation site
Tyk 2	Tyrosine-protein kinase 2
ISRE	IFN-stimulatory element
CaM Φ	Classically activated macrophages
AaM Φ	Alternatively-activated macrophages
iNOS	Nitric oxide synthases inducible
4-HNE	4-hydroxynonenol
MESA	Mature Parasite-infected Erythrocyte Surface Antigen
RESA	Ring Erythrocyte Surface Antigen
MIP	Macrophage inflammatory proteins
MCP-1	Monocytes chemotactic protein-1
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
PAF	Platelet activating factor
TRAF	TNF receptor-associated factor

TNFR1	Tumor necrosis factor receptor
PLAD	Pre-ligand-binding regions
TRADD	TNF receptor 1-associated death domain
RIP	Receptor interacting protein
IKK	I κ B kinases
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
c-IAP	Cellular inhibitor of apoptosis-1
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
FADD	Fas associated death domain
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
PGE2	Prostaglandines E2
GATA-3	Trans-acting T-cell-specific transcription factor
PAMPS	Pathogen-associated- molecular patterns
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
ERK	Extracellular signal regulated Kinase
JNK	Jun N-terminal kinase
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinas
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
TCR	T cell receptor
Bcl-X _L	B-cell lymphoma-extra large
GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol
cPLA2	Cytoplasmique phospholipase A2
SAPK	Stress activated protein kinase
ETS	E-twenty six
JAB1	Jun activation domain-binding protein-1
AP1	Activator protein 1
KIP	Kinase inhibitor protein
CFU-S	Colony-Forming Units-Spleen

LISTE DES FIGURES

Figure 1: La neutralisation du MIF réduit la parasitémie lors de l'infection par <i>P. c. adami</i>	p22
Figure 2: Présentation des voies de signalisation de l'IFN- γ et de l'IFN- α .	p28
Figure 3: Voie de signalisation des TLRs.	p43
Figure 4: Voie de signalisation du MIF.	p46
Figure 5: La neutralisation du MIF change le profil de sécrétion de l'IFN- γ , de l'Il-10 et du TNF- α .	p48
Figure 6: Systemic release of MIF during <i>P. c. adami</i> (DK) infection.	p63
Figure 7: Cytokine responses in total SPC, CD4 ⁺ T and CD90 ⁻ splenic cells from wild type (WT) and MIF KO <i>P.c. adami</i> infected mice harvested at days 4 (A-C) and day 8 (D-E) post-infection.	p64
Figure 8: IL-4 responses in total (SPC), CD4 ⁺ T and CD90 ⁻ splenic cells from wild type (WT) and MIF KO <i>P.c. adami</i> infected mice harvested at days 4 (A), day 8 (B) and day 12 of infection.	p65
Figure 9: Percentages and absolute numbers of total and activated CD4 ⁺ T cells in <i>P. c. adami</i> infected mice (day 4 post-infection).	p66
Figure 10: Determination of T-bet and GATA3 gene expression levels in CD4 + T cells purified from naive and <i>P.c. adami</i> DK-infected mice at day 4 post-infection infection by RT-PCR.	p67
Figure 11: Prolifération and cytokine responses in purified CD4 ⁺ T cells from naive wild type (WT) and MIF KO mice stimulated <i>in vitro</i> with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies.	p68
Figure 12: Cytokine responses in purified CD4 ⁺ T cells from naive wild type (WT) and MIF KO mice stimulated under T _H 1 or T _H 2 polarizing conditions.	p69
Figure 13: L'absence de MIF n'altère pas le niveau d'hémoglobine durant l'infection avec <i>P. c. adami</i> (DK).	p76

Figure 14: La déficience en MIF amène à une baisse de la concentration d'hémoglobine plus accentuée durant l'infection par *P. c. adami* (DS). **p77**

Figure 15: L'absence de MIF diminue l'anémie durant l'infection non létale avec *P. c. adami* (DK). **p78**

Figure 16: En absence de MIF, une réticulocytose accrue est mesurée en réponse à l'infection avec *P. c. adami* (DS). **p79**

Figure 17: L'absence de MIF amène à une baisse de l'expression basale de TLR2 mais n'altère pas l'effet modulateur de l'infection au début de l'infection. **p80**

Figure 18: L'absence de MIF baisse l'expression basale de TLR4 chez les lymphocytes T mais n'altère pas l'effet modulateur de l'infection au début de l'infection. **p81**

Figure 19: La déficience de MIF induit une baisse dans l'expression basale de TLR2 n'altère pas l'effet modulateur de l'infection au pic de l'infection. **p82**

Figure 20: En absence de MIF, diminution dans l'expression basale de TLR4 chez les lymphocytes T n'altère pas l'effet modulateur de l'infection au pic de l'infection. **p83**

RÉSUMÉ

Le facteur d'inhibition de la migration des macrophages (MIF) joue un rôle important dans la régulation du système immunitaire inné et adaptatif. Le MIF est impliqué dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques dû à sa capacité à induire la sécrétion du facteur nécrosant tumoral (TNF- α) et de l'interleukine-12 (IL-12), en plus de favoriser l'expression des récepteurs de type Toll (TLR) 4 chez les macrophages. Paradoxalement, la neutralisation du MIF augmente l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et diminue la réponse humorale *in vivo* qui sont des résultats inattendus considérant le rôle du MIF comme pro-inflammatoire et inducteur d'IL-12. Étant donné que la sécrétion de MIF est induite chez les souris BALB/c infectées avec *Plasmodium chabaudi adami* (DK) et que la résolution de cette infection nécessite une réponse Th1 couplée à une production d'IFN- γ , nous avons évalué l'effet de la déficience en MIF sur la cinétique d'infection ainsi que sur l'activation des lymphocytes CD4⁺. Nos résultats montrent un meilleur contrôle de l'infection avec *Plasmodium chabaudi adami* (DK) chez des souris déficientes en MIF (MIF/KO), caractérisé par un pic et une parasitémie cumulative significativement plus faible. D'autre part, une anémie plus modérée, déterminée par une plus faible expression des précurseurs érythroïdes et des réticulocytes a aussi été mesurée chez des souris MIF/KO lors de l'infection. Au jour 4 post-infection, le pourcentage et le nombre absolu de cellules CD4⁺ spléniques activées était plus important chez les souris MIF/KO, de plus, ces cellules sécrétaient plus d'IFN- γ , moins d'IL-10 et d'IL-4. De manière intéressante, la production précoce d'IL-4 par une population des cellules spléniques non B et non T (possiblement des basophiles) a été fortement inhibée chez les souris MIF/KO lors de l'infection. Une observation collatérale dans notre étude a été la surexpression du facteur de transcription T-bet chez des cellules T CD4⁺ naïves déficientes en MIF. Étant donné que les lymphocytes CD4⁺ déficients en MIF sécrètent plus d'IFN- γ et moins d'IL-4 suite à leur stimulation *in vitro*, nos résultats suggèrent que le MIF module la capacité des lymphocytes CD4⁺ à sécréter des cytokines de type Th1. De plus, elle suggère aussi la présence d'une corrélation entre l'expression plus forte de T-bet et le phénotype Th1 accentué chez les lymphocytes CD4⁺ déficients en MIF. Par contre, cette régulation n'impliquerait pas la voie des récepteurs TLR étant donné qu'aucune modulation de ces récepteurs par le MIF n'a été observée.

MOTS CLÉS: MIF, *Plasmodium*, IFN- γ , IL-4, Lymphocyte

INTRODUCTION

Le facteur inhibiteur de la migration des macrophages (MIF) est une cytokine qui joue plusieurs rôles dans la régulation de la réponse des systèmes immunitaires innés et adaptatifs par les voies autocrines, paracrines et endocrines [1,2]. Le MIF est produit par plusieurs types cellulaires dont les monocytes, les macrophages, les cellules de la glande pituitaire et les lymphocytes, en réponse à divers stimuli allant des endotoxines tels que le lipopolysaccharide (LPS), des exotoxines Gram-positif, l'hémozoïne (pigment malarique), les cytokines inflammatoires, les oxydants et les glucocorticoïdes [3]. Des études précédentes ont montré que le MIF pourrait protéger contre l'action pathogénique des bactéries et parasites ou au contraire, favoriser l'infection [2, 4, 5 ,6]. Dans des conditions de sécrétion accrue, le MIF est impliqué dans l'auto-immunité, l'inflammation et la pathogénicité d'un grand nombre de parasites [6]. Le MIF produit de manière constitutive, contre-régule directement l'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes en induisant la production de diverses cytokines pro-inflammatoires [7]. Lors d'une infection, les pathogènes induisent un seuil de MIF nécessaire pour la production des cytokines inflammatoires telles que l'interleukine-12 (IL-12), l'interféron-gamma (IFN- γ), le facteur tumoral nécrosant (TNF- α) et l'oxyde nitrique (NO) [5, 8, 9]. Le MIF augmente l'expression des molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM-1) et des récepteurs de type Toll (TLR)-4 chez les macrophages [8]. Lors d'une infection par *Plasmodium falciparum*, l'un des agents étiologiques de la malaria, l'anémie et l'inflammation systémique conduisent à une augmentation de la cytoadhésion des érythrocytes parasités sur les parois vasculaires, ce qui augmente la sévérité des symptômes de la malaria [8]. L'anémie causée par *Plasmodium* est le résultat d'un processus accéléré de destruction des érythrocytes et de l'inhibition de la production des nouveaux érythrocytes par suppression de l'érythropoïèse [11]. Il a été suggéré que le MIF est

un puissant inhibiteur du développement, de la différenciation et de la production d'hémoglobine chez les précurseurs des érythrocytes [11, 12, 13]. Il est aussi connu que *Plasmodium* utilise l'hémoglobine comme source de protéines, et polymérise l'hème dérivé sous forme d'hémozoïne, moins toxique pour le parasite. L'hémozoïne est un fort stimulateur de la sécrétion de MIF [14].

De récentes études ont démontré que le MIF est aussi sécrété par des lymphocytes auxiliaires (T helper) de type 2 (Th2), cellules nécessaires pour l'activation de cellules B et la production d'anticorps [3, 6]. Ainsi, le MIF joue un rôle dans la production d'anticorps ainsi que dans l'activation et la prolifération des lymphocytes Th2 au détriment des cellules Th1 [3,10].

Dans notre laboratoire, le modèle de malaria par *Plasmodium chabaudi adami* est utilisé pour étudier les interactions entre les cellules T et les macrophages durant l'infection. Des études récentes ont impliqué le MIF dans l'anémie paludique, sans néanmoins caractériser les effets du MIF sur les cellules T et les macrophages [109].

En préliminaire, une évaluation de l'effet de la neutralisation du MIF dans la cinétique d'infection par *Plasmodium chabaudi adami* (souche DK) chez les souris BALB/c a été effectuée. La parasitémie durant l'infection ainsi que les modifications des profils de certaines cytokines-clés ont été mesurées chez des souris traitées avec l'anticorps anti-MIF neutralisant. La neutralisation de MIF a amené à une chute importante de la parasitémie et à une augmentation des niveaux d'hémoglobine durant l'infection, sans trop modifier les précurseurs érythroïdes dans la moelle osseuse et la rate. Étant donné que le MIF est sécrété chez les souris BALB/c infectées avec *Plasmodium chabaudi adami* (DK) ou (DS) et que la résolution de cette infection nécessite une réponse Th1 couplée à une production précoce d'IFN- γ , notre hypothèse était que le MIF pourrait inhiber l'activation des cellules Th1 durant l'infection. Nous avons élevé des souris déficientes en MIF pour évaluer l'effet de la

déficience en MIF sur le déroulement de l'infection et sur la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD4⁺ (cluster de différenciation). En parallèle, nous avons aussi suivi l'expression de TLR2 et TLR4 durant l'infection étant donné que l'expression des TLR par les lymphocytes T semble influencer leur activation.

Nos résultats ont démontré une anémie plus modérée et un meilleur contrôle de l'infection avec *P. c. adami* (DK) chez les souris déficientes en MIF (MIF/KO). Notre analyse suggère que le MIF favorise le développement d'une réponse de type Th2 lors de l'infection par sa capacité à moduler la production d'IL-4 autant chez des cellules non T que chez les cellules T CD4⁺. Nous postulons que le phénotype plus pro-Th1 mesuré chez des cellules T CD4⁺ déficientes en MIF semblerait lié à une expression basale élevée de T-bet, un facteur de transcription ayant un rôle important dans l'induction des cellules Th1.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 La malaria

La malaria est une maladie causée par des protozoaires du genre *Plasmodium*. Ces parasites qui infectent les hépatocytes ainsi que les érythrocytes, sont transmis par la piqure d'un moustique de type *Anophèle*. Chaque année, 200 à 300 millions d'individus en sont infectés et 2,5 millions en meurent, en faisant de la malaria une des maladies la plus néfaste [15-17].

Il existe quatre espèces de *Plasmodium* pouvant infecter l'humain: *P. ovale*, *P. malaria*, *P. vivax* et le plus virulent de tous, *P. falciparum*. Le cycle d'infection de *Plasmodium* comprend la phase exoérythrocytaire qui se caractérise par l'infection des cellules du foie par les parasites (sporozoïtes) et la phase érythrocytaire comprenant l'infection des érythrocytes par les mérozoïtes venant des cellules hépatiques infectées. Les mérozoïtes se développent entourés d'une vacuole membranaire parasitaire et lysent l'érythrocyte parasité pour envahir d'autres érythrocytes une fois leur croissance terminée. La phase d'infection chez les érythrocytes est responsable des symptômes cliniques observés chez les malades tel que des céphalées, de la fièvre et dans des cas plus sévères de la maladie, des complications comme l'anémie sévère, l'œdème pulmonaire, l'insuffisance rénale et la malaria cérébrale, liées surtout à *P. falciparum* [2, 15, 16, 19-21].

Durant près de 50 ans des médicaments comme la chloroquine et des antifoliques

ont été utilisés pour contrer la pandémie liée aux infections par *Plasmodium*. La chloroquine est présentement le médicament le plus utilisé dans les régions touchées par la malaria; elle agit dans la vacuole digestive du trophozoïte, empêchant par son action la transformation de l'hème en hémotoïne et rendant ainsi les parasites plus vulnérables au stress oxydatif. En effet, l'hème, substance toxique pour le parasite, est produit suite à la dégradation de l'hémoglobine présente dans l'érythrocyte par *Plasmodium*. Ainsi, pour éviter cette toxicité, le parasite polymérise l'hème en cristaux inertes appelés hémotoïne. La chloroquine, une base faible dans un milieu acide, traverse la membrane vacuolaire sous sa forme neutre et s'accumule dans la vacuole digestive du parasite, celle-ci étant acide. Une fois dans la vacuole digestive, la chloroquine (et les autres quinoléines) agissent en se liant de manière non-covalente à l'hème formant subséquemment un complexe qui empêche le processus de séquestration de l'hème en hémotoïne dans la vacuole et par le fait même, induit l'empoisonnement et la mort du parasite [13, 20, 22].

Des isolats mutants de *P. falciparum* et de *P. vivax* résistants à certains médicaments antimalariques ont commencé à apparaître depuis quelques années et se propagent dans plusieurs zones endémiques. Ces pathogènes résistants présentent une mutation dans le gène *pfcr*, qui code pour une protéine transmembranaire de 48kDa, la PFCRT (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) localisée dans la vacuole digestive du parasite. Cette protéine est impliquée dans la résistance à la chloroquine, ayant ainsi pour conséquence de réduire l'accumulation du médicament dans la vacuole digestive en augmentant son excrétion hors du parasite vers le cytoplasme de l'érythrocyte infecté [20, 22].

Les mutations chez *Plasmodium* confèrent au parasite une grande diversité et variabilité génétique. La diversité génétique fait référence au polymorphisme des allèles d'un antigène exprimé continuellement durant un stade du cycle de vie du parasite, tandis que la variabilité antigénique se réfère à une large famille de gènes codants pour un groupe d'antigènes s'exprimant de manière alternée et correspondant

aux divers variants d'un antigène [18]. Dans la large famille des gènes, on retrouve les gènes *var* codant pour des antigènes appelés *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1), qui sont des récepteurs d'érythrocytes infectés qui leur permettent d'adhérer aux cellules endothéliales [16].

De ce fait, la diversité et la variabilité génétique de *Plasmodium* rendent difficiles tant l'acquisition d'une immunité dans les régions à haut risque d'infection que la production d'un vaccin efficace et à large spectre d'action. Cette diversité antigénique issue des mutations liées aux erreurs de réplication d'ADN, joue aussi un rôle important dans la résistance du parasite aux médicaments déjà existants ainsi que dans le niveau de virulence observé lors de l'infection [23].

Néanmoins, il est connu que des personnes vivants dans des zones à risque, peuvent acquérir une certaine immunité appelée «prémunition» suite à des nombreuses infections durant plusieurs années [21]. Cette immunité dépend de l'espèce et de la souche de parasite qui les infecte et cela explique pourquoi une immunité croisée peut être observée entre deux souches apparentées ayant plusieurs séquences d'ADN homologues [24]. Cette protection peut être partiellement transférée de manière passive d'un individu immunisé à un individu naïf par des anticorps IgG, ou de manière adaptative par le transfert des cellules T [25].

1.2 Modèles murins de malaria

Afin de mieux comprendre l'impact de *Plasmodium* sur le système immunitaire et ainsi favoriser les avancées vers la découverte d'un vaccin polyvalent et efficace, des modèles de la malaria chez la souris ont été développés avec des parasites isolés des rongeurs sauvages d'Afrique [26]. L'utilisation de ces modèles

offre plusieurs avantages par rapport à l'utilisation des modèles simiens. Les modèles murins sont faciles et peu coûteux à maintenir, le système immunitaire de leur hôte, la souris, est bien caractérisé et des similarités sont observées entre la réponse immune de la souris et celui de l'homme [18]. Sur le plan éthique, certaines manipulations sont plus pratiques et acceptables sur des petits animaux comme les souris que sur les primates ou les humains [26].

En recherche, les modèles murins sont sélectionnés en fonction de leurs niveaux de virulence chez l'hôte ainsi qu'en fonction de la réponse immunitaire activée. De ce fait, les principales espèces utilisées comme modèle sont: *P. berghei*, *P. vinckei*, *P. yoelii* et *P. chabaudi*. Les caractéristiques de l'infection varient tout dépendant de l'espèce et de la souche de parasite utilisé ainsi que l'haplotype de la souris hôte. Or, certaines espèces telle que *P. berghei* et *P. vinckei* ainsi que la souche 17XL de *P. yoelii* et la souche DS de *P.c. adami* causent une infection létale chez la souris tandis que la létalité des souches AS et DK de *P. chabaudi* est dépendante de l'haplotype de la souris infectée. Ces modèles sont utiles lorsque l'on veut étudier les effets thérapeutiques d'un produit sur l'infection. Par contre, pour étudier les mécanismes impliqués dans l'acquisition d'une immunité, les infections par des espèces du parasite non virulentes, *P. yoelii*, *P. chabaudi adami* DK, *P. chabaudi chabaudi* AS et *P. vinckei petteri* sont favorisées car l'infection est résolue à plus ou moins longue échéance [27]. Dans le cadre de cette étude, nous avons évalué l'impact d'une déficience en MIF chez des souris BALB/c suite à une infection avec la souche DK de *P. chabaudi adami* (*P. c. adami*). Ce modèle, bien caractérisé dans notre laboratoire, offre l'avantage d'induire une infection qui est rapidement résolue par des cellules T CD4 auxiliaires Th1. Nos résultats ont confirmé les observations de Benoit Bélanger, qui a employé la neutralisation du MIF comme stratégie. Spécifiquement, au début et au pic d'infection avec les souches DK et DS, un meilleur contrôle de la parasitémie a été mesuré chez les souris déficientes en MIF

(fig. 1A-1C). De plus, après le pic de parasitémie, un certain délai a été observé dans la résolution de l'infection avec *P. c. adami* (DK) suite à la neutralisation du MIF (fig. 1A). Cependant, la létalité de la souche (DS) chez les souris BALB/c a rendu impossible l'étude de l'effet de l'absence du MIF sur la résolution de l'infection après le pic de parasitémie (fig. 1D).

De ce fait, étant donné que les souches non létales permettent de mettre en évidence les mécanismes protecteurs de la réponse immunitaire et les effets des cytokines sur cette réponse au début et à la fin de l'infection, il était préférable d'utiliser la souche *P. c. adami* (DK) dans la subséquente étude.

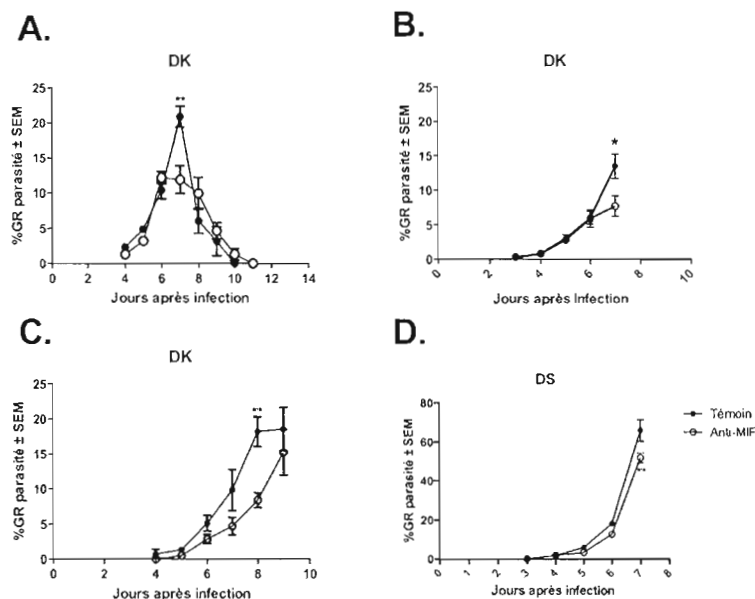


Figure 1: La neutralisation du MIF réduit la parasitémie lors de l'infection par *P. c. adami*. Les souris ont été infectées par la voie intraveineuse (i.v) avec 10^5 érythrocytes parasités par la souche DK (A à C) et par la souche DS (D), et ont été traitées (cercle blanc) avec 0,5mg d'anticorps monoclonal neutralisant anti-MIF aux jours -3, 0, 3 et 6 après l'infection ou avec 0,5 mg d'anticorps isotype contrôle (IgG1) aux jours -3, 0, 3, 6 (Témoin, cercle noir). La parasitémie (pourcentage de globule rouge (GR) parasité) a été calculée chaque jour par une coloration au Giemsa des frottis après fixation au méthanol. (A) Cinétique d'infection complète, (B et C) cinétique d'infection des souris sacrifiées au pic de l'infection. Pour l'expérience A quatre souris ont été utilisées dans chacun des groupes et l'expérience a été répétée à 1 seul fois reprises tandis que pour l'expérience B et C quatre souris ont été utilisées dans chacun des groupe et les résultats des deux expériences sont présentés. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Figure tirée de la référence [108].

1.3 Implication de la rate dans le contrôle de la parasitémie

Deux heures après l'infection, approximativement 50% des sporozoïtes inoculés par le moustique restent bloqués dans le derme. Des 50% qui réussissent à quitter le site d'infection, le deux tiers envahissent les vaisseaux sanguins pour rejoindre le foie tandis que le tiers restant envahit la circulation lymphatique et est retenu dans le ganglion lymphatique proximal où une partie des parasites seront détruits par les cellules dendritiques [28]. Des récentes études ont montré *in vivo* et *in vitro* que durant leur développement dans le foie, les mérozoïtes inhibent la mort cellulaire des hépatocytes tout en générant une vésicule appelée mérosome. Les sporozoïtes traversent et endommagent plusieurs hépatocytes avant de s'installer dans l'un d'eux pour proliférer. Ainsi, la destruction des hépatocytes amène à l'induction du facteur de croissance des hépatocytes (HGF, hepatocyte growth factor) qui en se fixant à son récepteur MET rend les cellules voisines plus susceptibles à l'infection. En plus, le HGF est aussi connu comme étant un activateur de l'inhibition de l'apoptose par la voie de signalisation de la Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), cet effet ne durant que quelques heures. L'activation de MET agit aussi comme un antagoniste de l'action pro-inflammatoire de $\text{TNF-}\alpha$ [29,30].

Les parasites ayant échappés aux cellules dendritiques dans le ganglion, aux anticorps dans la circulation sanguine ou aux lymphocytes CD8+ dans le foie subiront une autre élimination dans la rate étant donné que cet organe, très important dans la filtration du sang, enlève de la circulation sanguine les érythrocytes endommagés ou parasités [17,28, 31, 32]. Une étude portant sur des érythrocytes parasités par *P. chabaudi adami* a permis de confirmer que dans le cas de ce modèle murin, les érythrocytes parasités sont éliminés par l'action phagocytaire des macrophages dans la pulpe rouge de la rate [33]. En plus de sa fonction de filtre, lors d'une infection par *Plasmodium*, la rate est aussi impliquée dans l'hématopoïèse ainsi que dans

l'activation et la multiplication des cellules T et B ayant une réponse spécifique au pathogène [32]. Elle limite donc la parasitémie et par le fait même, les symptômes cliniques associés à la malaria [25].

1.4 Système immunitaire inné

Les systèmes immunitaires innés et adaptatifs sont engagés dans le contrôle et l'éradication des pathogènes. L'immunité innée est la première réponse qui s'active sans immunisation ni vaccination préalable et se met en place dès le début de l'infection ou suite aux dommages tissulaires jusqu'à l'intervention de l'immunité acquise [25]. La réponse immunitaire innée joue de ce fait un rôle crucial dans le contrôle du développement de *Plasmodium* durant le stade pré-érythrocytaire ainsi qu'intra-érythrocytaire [34]. À ce niveau, l'immunité antiparasitaire implique l'activation de neutrophiles, des cellules polynucléaires phagocytes (macrophages), des cellules dendritiques, des lymphocytes T gamma-delta ($T\gamma\delta$) et des cellules Natural killer (NK) durant la phase non spécifique de la réponse immunitaire [26].

Les cellules NK sont des cellules effectrices essentielles dans le système immunitaire inné, jouant un important rôle au début de la réponse immunitaire de l'hôte contre une profusion de pathogènes incluant les virus, les bactéries et les parasites. Les cellules NK se distinguent par l'expression des récepteurs CD49b, ASGM1 et NK 1.1 qui sont utilisés expérimentalement comme marqueurs de reconnaissance cellulaire [35]. Des récentes études ont permis l'identification de sous-populations de cellules NK portant des récepteurs appartenant à des familles distinctes et dont les fonctions physiologiques diffèrent. Certaines cellules NK ont des récepteurs appartenant à la famille des homodimères Ly49 qui reconnaissent les molécules CMH de classe I de la voie classique, tandis que le récepteur hétérodimère NKG2/CD94 interagit avec des molécules de classe I non classique tel que Qa-1 [36].

D'autres récepteurs tels que ceux appartenant à la superfamille des immunoglobulines et les récepteurs cytotoxiques naturels (NCR) composent l'arsenal utilisé par les cellules NK pour la reconnaissance d'un grand nombre de molécules appartenant au soi ou au non soi [37, 38]. Par contre, chaque famille de récepteurs possède des récepteurs inhibiteurs et activateurs. Conséquemment, les fonctions des cellules NK dépendent de la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs favorisant ainsi soit une action cytotoxique ou une production de cytokines [35].

Lors d'une infection par *P. falciparum in vitro*, les cellules NK peuvent devenir cytotoxiques envers les érythrocytes infectés par une activité similaire à celle observée chez les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), cependant, diverses études effectuées sur le sujet se contredisent [31, 38]. Ainsi, les cellules NK reconnaissent les altérations des surfaces membranaires de l'érythrocyte parasité ce qui induit la libération des perforines qui provoqueront la lyse de la cellule tout en sécrétant des inducteurs d'apoptose, les granzymes [35].

Les cellules NK représentent aussi la principale source d'IFN- γ au début de l'infection par *P. falciparum*. Elles sont activées par l'IL-12 produit par les macrophages et les cellules dendritiques et l'IL-18 produit par les macrophages. Par contre, les cellules NK sont inhibées par l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- β [35]. De plus, l'expression des récepteurs CD16 et Fc γ RIIIA qui se fixent aux fragments Fc des anticorps, confère aux cellules NK un répertoire très vaste de reconnaissance à travers les IgG1 et IgG3 [25]. Une étude de Roland et al, (2006) a indiqué que les cellules NK du foie sont capables de détruire les cellules hépatiques infectées par *P. yoelii* sans pour autant être aptes à éliminer les érythrocytes infectés [36].

1.5 Interféron gamma (IFN- γ)

Les interférons (IFN) sont des cytokines représentant la première ligne de défense contre des infections virales, bactériennes et parasitaires. Il existe deux types d'IFN sécrétés chez l'humain; ceux du type I, incluant l'IFN- α et β dont la sécrétion par la majorité des cellules est induite par la présence d'ARN double brin de certains virus [39].

L'IFN du type II (IFN- γ) par contre, est sécrété par les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes T CD4+ Th1 et cette production est induite par la présence des antigènes et des cellules NK [40].

L'IFN- γ est une cytokine N-glycosylée de 166 acides aminés qui se lie à un récepteur composé de deux sous-unités: la sous-unité IFNGR1, qui est responsable de la liaison à l'interféron, et la sous-unité IFNGR2 qui transmet une part du signal dans la cellule. La liaison de l'IFN- γ sous la forme dimérique à la sous-unité IFNGR1 permet l'association des deux sous-unités du récepteur. Des résidus tyrosine situés sur sa partie intracytoplasmique sont associés aux protéines kinase cytoplasmiques Jak1 et 2 qui s'auto-phosphorylent suite à la fixation de l'IFN- γ tel que décrit à la figure 1 [39].

Suite à la phosphorylation des Jaks, le complexe IFNGR1/IFNGR2 phosphorylé permet le recrutement de deux protéines Stat1 (signal transducers and activators of transcription) qui sont des activatrices de la transcription, en les liant par leur domaine SH2 (Src homology domain). L'homodimère de Stat formé et phosphorylé se dissocie du récepteur et se transloque dans le noyau pour se lier aux séquences palindromique GAS (gamma interferon activation site, TTNCNNNA) situées sur le promoteur des gènes inductibles par l'IFN- γ [41].

En présence de *Plasmodium*, la cascade de signalisation qui entre en jeu dans la liaison de l'IFN- γ à son récepteur joue un rôle crucial dans la régulation de

l'immunité adaptative: elle augmente la capacité des cellules NK à détruire les érythrocytes parasités et surtout, elle est nécessaire à l'augmentation de l'activité phagocytaire des monocytes et des macrophages et à l'induction de la réponse Th1 [42].

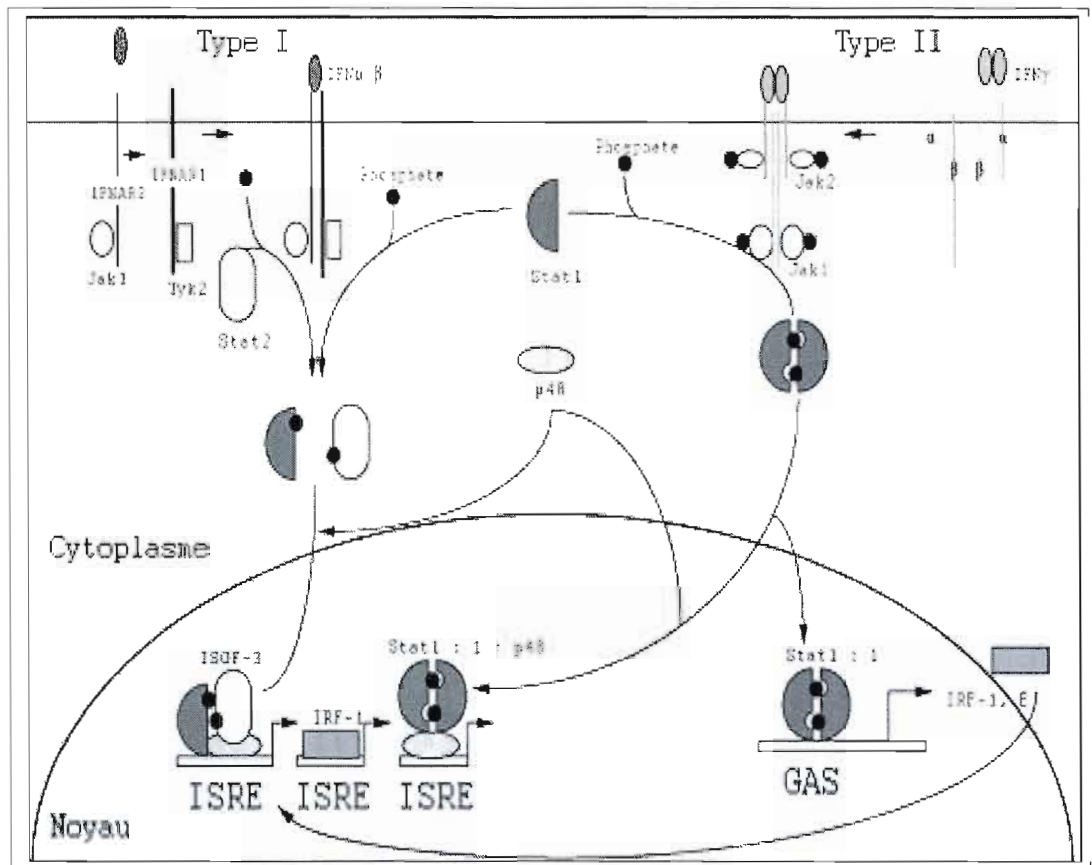


Figure 2: Présentation des voies de signalisation de l'IFN- γ et de l'IFN- α . L'association de deux récepteurs d'IFN de type I active les protéines kinase Jak 1 et Tyk 2 associées respectivement aux sous-unités IFNAR2 et IFNAR1. Les Jaks activés entraînent la phosphorylation du récepteur et l'apparition des sites d'ancrage tyrosine sur lequel le domaine SH2 de la protéine activatrice de la transcription-2 (Stat-2) se fixe. De ce fait, Stat-2 est phosphorylée permettant par là, la fixation et l'activation de Stat-1. Le complexe Stat-2-Stat-1 se détache du récepteur dimérique de l'IFN et migre vers le noyau où, il se fixe à P48 pour former un complexe de liaison à ISRE. La séquence ISRE peut se lier à un complexe formé de deux Stat 1 et une protéine P48 suite à la dimérisation du récepteur IFNR1- α ayant été activé par l'IFN- γ . Dans cette voie d'activation, les Jak 1 et Jak 2 s'activent et se phosphorylent réciproquement permettant ainsi la fixation et la phosphorylation de Stat 1 qui forme un complexe homodimérique qui migre vers le noyau pour se lier à la séquence GAS.

Figure tirée de la référence [41].

1.6 Les macrophages

Les macrophages sont des cellules d'origine myéloïde qui jouent des rôles importants dans l'immunité. Ils sont impliqués dans la phagocytose, dans le déclenchement et la régulation de l'inflammation, dans l'apprêtement et la présentation des antigènes aux lymphocytes T ainsi que dans la production de cytokines telles que l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-10, qui régulent l'immunité adaptative [43].

Plusieurs sous-groupes de macrophages ont été identifiés à ce jour selon leurs voies d'activation et les mieux caractérisés sont les macrophages activés par la voie classique (classically activated macrophages, (caM Φ)) et les macrophages activés par la voie alternative (alternatively-activated macrophages) (aaM Φ) [44].

Les caM Φ sont activés par des molécules et cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , le TNF- α , ainsi que par contact avec des pathogènes qui induisent une forte réponse pro-inflammatoire [45]. Leur capacité à produire de l'oxyde nitrique (NO) et à apprêter et présenter des antigènes, combinée à une forte expression de CMH de classe II et de CD86 permet de les distinguer des aaM Φ qui sont activés par les IL-10, IL-13, IL-4, le facteur de croissance de tumeur (TGF)- β et les glucocorticoïdes [46]. Les caM Φ jouent un important rôle dans le contrôle des pathogènes intracellulaires par l'augmentation du stress oxydatif et la sécrétion de NO [44]. Leur capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires comprenant le TNF- α , IL-1 et IL-6 leur permettent d'avoir une activité antiproliférative et cytotoxique sur les cellules infectées [47].

Par contre, contrairement aux caM Φ qui sont fortement influencés par les cytokines pro-inflammatoires, les aaM Φ associées à des réponses Th2, sont incapables de générer du NO via la voie L-arginine, car l'enzyme NO synthétase inductible (iNOS) est exclusivement régulée par l'IFN- γ . L'IL-4 et l'IL-10 produits par des stimuli de

type Th2 induisent l'activation de l'enzyme arginase et conduisent à la production de L-ornithine et d'urée [48]. De ce fait, l'incapacité des aaMΦ à produire du NO explique leur impuissance à limiter la croissance des pathogènes intracellulaires. Les aaMΦ secrètent des molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF-β qui ont un effet antagoniste sur le processus d'inflammation initié par les caMΦ [45]. La différenciation des aaMΦ résulte de la phagocytose de cellules apoptotiques et, tout comme les caMΦ, ces cellules expriment les molécules co-stimulatrices CD11a, CD40, CD54, CD58, CD80, CD86 en plus d'avoir des capacités endocytiques et phagocytiques et d'augmenter l'expression des molécules du CMH de classe II [44].

Lors d'une infection par *Plasmodium*, les deux sous-groupes de macrophages nommés précédemment sont activés autant, pour établir la réponse Th1 avec les caMΦ que pour induire une réponse Th2 avec les aaMΦ. Les macrophages ingèrent des érythrocytes parasités et non parasités dont la membrane est devenue anormalement rigide. La rigidité de la membrane est due soit au vieillissement de l'érythrocyte ou à la présence de nouveaux antigènes exprimés par le parasite chez l'érythrocyte. De plus, l'hémozoïne rend la membrane des érythrocytes infectés et non infectés moins souple à cause de sa capacité à générer du 4-hydroxynonenol (4-HNE) [49-51]. Certains de ces antigènes se lient au cytosquelette membranaire rendant ainsi l'érythrocyte immunogénique et donc reconnaissable par les cellules phagocytaires. L'antigène MESA (Mature Parasite-infected Erythrocyte Surface Antigen) qui se lie à la bande 4.1 et le RESA (Ring Erythrocyte Surface Antigen) qui se lie à la spectrine font partie des antigènes affectant le cytosquelette de l'érythrocyte [52]. De plus, le stress oxydatif généré par le parasite durant l'infection contribuerait à la perte de la flexibilité membranaire de la cellule hôte [53].

La production d'hémozoïne dans les érythrocytes parasités est observée 48 heures après l'infection. L'hémozoïne perturbe la capacité phagocytaire des macrophages ainsi que le mécanisme de destruction des parasites intra-érythrocytaires par génération de radicaux superoxydes [54].

L'hémozoïne possède des propriétés pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Elle active et induit les cellules dendritiques et les macrophages à produire une profusion de cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines incluant l'IL-6, l'IL-8, les protéines inflammatoires de macrophages (MIP-1 et MIP-2), les protéines chimiotactique de monocyte-1 (MCP-1), le NO et certaines cytokines anti-inflammatoires comprenant l'IL-10 [55]. Par contre, l'hémozoïne inhibe la production d'IL-12 et en ce qui concerne la production de TNF- α , son effet semble être contradictoire. Certains articles suggèrent que l'hémozoïne a un effet d'inhibition tandis que d'autres articles ont observé une hausse dans la production de TNF- α [56, 57]. Les changements résultant de l'action de l'hémozoïne sont associés à la malaria sévère observée chez certains enfants Africains [57].

1.7 Oxyde nitrique (NO)

Le NO est un gaz instable qui a plusieurs fonctions biologiques, aussi bien dans le maintien vasculaire et dans la modulation de la réponse inflammatoire que dans la défense contre des pathogènes [58].

Dans l'infection par *Plasmodium*, le NO est un inhibiteur des différents stades du cycle infectieux du parasite car il empêche la croissance de *P. falciparum*, *P. c. chabaudi* et *P. berghei* de manière réversible par l'inhibition de l'enzyme falcipain. Cette enzyme dégrade les fragments d'hémoglobine de l'hôte en petits peptides dans la vacuole digestive et joue ainsi un rôle essentiel dans le métabolisme du parasite [59, 60].

L'enzyme iNOS a des sites qui lui permettent de se lier avidement à l'hémoglobine. Lors de l'infection par *Plasmodium*, la dégradation de l'hémoglobine dans le cytoplasme suite à la multiplication et à la maturation des parasites intra-érythrocytaires (avec plus d'hémozoïne), favorise une importante libération d'iNOS

couplée à la production de NO, expliquant ainsi la susceptibilité accrue des parasites au NO [59]. Il a été néanmoins rapporté que le NO aurait en partie un effet immunosuppresseur dans l'infection expérimentale par *P. vinckei vinckei* et *P. chabaudi* K556 et dans l'inhibition de la prolifération de lymphocytes Th1, cette inhibition semblant être liée au blocage de la sécrétion d'IL-2 [61].

Le NO serait aussi impliqué dans certains symptômes de la malaria cérébrale chez l'humain. Taylor-Robinson (1995) suggère que le NO sécrété par les cellules endothéliales *via* la stimulation de TNF- α , diffuse au cerveau et débalance la régulation du glutamate, qui induit le NO neuronal, ce qui amène à l'altération de la transmission neuronale et au coma en plus de contribuer à l'anémie chez des enfants infectés [26].

Lors d'une infection par *P. chabaudi*, la présence de TNF- α , d'IFN- γ et d'IL-12 est nécessaire à la production de NO *in vivo* par les macrophages de la rate [61]. Un certain nombre de cytokines sont capables d'inhiber l'expression de l'enzyme iNOS et celles-ci incluent le TGF- β , l'IL-4 et l'IL-10 [63].

1.8 Le Facteur de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor, TNF)

Le facteur de nécrose tumorale (TNF), une molécule non glycosylée de 157 acides aminés, est une cytokine de 17kDa qui est médiatrice de l'immunité innée. Il se retrouve sous la forme membranaire ou sécrétée et son expression suivie de son activation nécessitent l'adoption d'une conformation trimérique. Il existe deux types de TNF, le TNF- α , aussi connu sous le nom de cachectine, et le TNF- β (lymphotoxine- α).

Le TNF- α est sécrété principalement par les monocytes et les macrophages mais les lymphocytes, les cellules NK et les mastocytes peuvent aussi le produire en moindres quantités [64]. Il est sécrété sous forme d'un précurseur pro-TNF de 26kDa

qui est clivé en TNF- α à l'aide d'une métalloprotéase, pour former le TNF- α soluble. Le TNF- β est produit principalement par des lymphocytes T activés [64].

La production de TNF- α est induite par les lipopolysaccharides bactériens, les antigènes parasitaires et les peroxydases [64]. Par ailleurs, les principaux stimuli endogènes responsables de la production de TNF- α sont l'IFN, l'IL-1, le facteur de croissance GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), les complexes immunitaires et le facteur activateur des plaquettes (platelet activating factor, PAF) [64]. Par contre, la production de TNF- α est inhibée par le TGF- β , l'IL-6, l'IL-10, les corticoïdes, la cyclosporine A et les prostaglandines E2 [64, 65].

Les TNF- α et β se lient à deux types de récepteurs appartenant à une super famille de près de 30 membres, subdivisées en trois groupes composés des récepteurs contenant le domaine de mort (death domain (DD)-containing receptors), les récepteurs de leurre (decoy receptors) et les récepteurs associés au facteur de liaison (TNF receptor-associated factor (TRAF) binding receptors). Les récepteurs TNFR1 (CD120a; p55/p60) de 55kDa et TNFR2 de 75kDa (CD120b; p75/p80) qui appartiennent au groupe des récepteurs contenant le domaine de mort, induisent une réponse pro-inflammatoire associée à plusieurs maladies chroniques [66, 67].

Les récepteurs TNFR1 et 2 sont des glycoprotéines transmembranaires ayant quatre motifs répétés riches en cystéines dans leur domaine extracellulaire. Les deux récepteurs sont composés d'un pré-ligand (pre-ligand-binding regions, PLAD) lié au domaine extracellulaire du récepteur qui favorise sa trimérisation surtout en présence de ligand TNF [68]. Le TNFR1, contrairement au TNFR2, possède un domaine de mort intracellulaire composé d'environ 80 acides aminés [68].

La chaîne p55 du récepteur TNFR1 est exprimée par les cellules sensibles aux effets cytotoxiques directs du TNF, tandis que la chaîne p75 du récepteur TNFR2 est plutôt exprimée sur les cellules d'origine myéloïde. Le récepteur TNFR1 est activé autant par des ligands solubles que des ligands membranaires mais le TNFR2 n'est activé que par des ligands membranaires [67].

La voie impliquant le récepteur TNFR1 semble initier la majorité des activités biologiques liées au TNF- α ainsi qu'au TNF- β . Suite à la fixation du ligand TNF au récepteur TNFR1, deux complexes distincts semblent participer à la signalisation cellulaire. Le complexe associé à la membrane plasmique appelé complexe I est composé d'une protéine adaptatrice (TNF receptor 1-associated death domain, TRADD) fixée au domaine intracellulaire du récepteur, qui recrute une protéine kinase qui interagit avec le récepteur RIP (receptor interacting protein), une protéine adaptatrice TRAF-2 (TNF receptor associated factor) et le complexe I κ B kinases R et C (IKK R et C) [68].

Ce complexe est responsable de l'activation de la voie impliquant le facteur nucléaire *kappa* B (NF- κ B) qui induit l'expression des gènes TRAF-1, TRAF-2, c-IAP1, c-IAP2 et FLIP, aboutissant à la production de plusieurs molécules anti-apoptotiques [69].

Le complexe II est composé en majorité d'éléments retrouvés dans le complexe I à l'exception du récepteur TNFR1, mais contrairement au complexe I, le complexe II contient aussi une protéine adaptatrice FADD (Fas associated death domain) et les caspases 8 et 10 initiatrices de l'apoptose. Ce complexe cytosolique se forme suite à la dissociation du complexe I du récepteur TNFR1 et possède la capacité d'induire l'apoptose lorsque la voie NF- κ B est déclenchée. Dans des cellules dont la voie NF- κ B est activée, il y a une surproduction de protéine inhibitrice de la caspase 8, FLICE ((caspase 8) inhibitory protein, FLIP), qui se lie partiellement à la caspase 8 et prévient ainsi le recrutement de la caspase 10 et éventuellement, l'apoptose. Si la voie NF- κ B est inactive suite à la fixation du récepteur TNFR1 à un ligand, la présence de FLIP diminue graduellement, permettant ainsi la fixation de la caspase 10 au récepteur et l'apoptose [68]. Ainsi, tout dépendant du contexte cellulaire dans lequel les macrophages se retrouvent, le TNF- α ou β peut avoir une action bénéfique ou au contraire délétère. Le TNF joue un rôle important dans la régulation de l'inflammation, car il favorise la synthèse de molécules pro-inflammatoires [70].

Le TNF- α augmente aussi la phagocytose et la cytotoxicité des neutrophiles, la production d'IL-1 et d'IL-6. Il inhibe la croissance des cellules endothéliales lors des cultures *in vitro* et il est aussi angiogénique *in vivo* [65]. Sur les cellules présentatrices d'antigène (CPA), le TNF active et augmente leur efficacité en stimulant la synthèse des molécules CMH de classe I et II [65]. Par ailleurs, le TNF induit la maturation des cellules dendritiques et accroît l'activation des lymphocytes B [69]. En synergie avec l'IL-2, les TNF- α et TNF- β induisent la différenciation des cellules NK d'une forme granulaire longue en lymphocyte tueur activé [69].

1.9 L'Interleukine 12 (IL-12)

Suite à l'activation de la réponse inflammatoire innée durant l'infection par *Plasmodium*, la sécrétion d'IL-12 par plusieurs cellules telles que les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les neutrophiles conduit à l'établissement de la réponse immunitaire adaptative [71]. La molécule bioactive IL-12 aussi appelée p70, est une cytokine hétérodimérique de 70kDa composée de deux sous-unités de 35 et 40kDa dont les gènes qui les codent sont localisés sur des chromosomes séparés [72]. Tandis que la sous-unité de 35kDa (p35) est exprimée constitutivement, celle de 40kDa (p40) est fortement régulée par l'activation des cellules productrices d'IL-12 et se retrouve largement exprimée par les cellules [72]. L'excès de production de l'IL-12 peut favoriser la formation des molécules homodimériques par des liens disulfures qui ont des fonctions antagonistes aux fonctions biologiques de la molécule bioactive IL-12. En effet, l'IL-12 p40 ayant une affinité similaire à l'IL-12 p70 pour le récepteur IL-12R, il entre en compétition avec cette dernière [73].

Le récepteur d'IL-12 est composé de deux chaînes, IL-12R β 1 et IL-12R β 2 qui sont impliquées dans l'activation de la voie de signalisation de Janus kinase (JAK) et

du facteur de transcription et transduction STAT4. En présence d'IL-12 p70, l'IL-12R est exprimé par des lymphocytes T et des cellules NK activées ainsi que par des cellules de la lignée des lymphocytes B et des cellules dendritiques [74].

L'IL-12 P70 est régulée par des mécanismes multiples. Tandis que les cytokines telles que l'IFN- γ et le GM-CSF induisent l'IL-12, l'IL-4, l'IL-10, l'IL-11, l'IL-13, le MCP-1, le TGF- β ainsi que des substances endogènes comprenant, les prostaglandines E2 (PGE2) et les corticoïdes sont des inhibiteurs de l'IL-12. Étonnamment, Kubata et al, (1998) ont rapporté que lors de l'infection par *P. falciparum*, des prostaglandines produites par le parasite inhibent la production d'IL-12 chez l'hôte [75].

En plus, les érythrocytes infectés par *P. falciparum* s'adhèrent aux cellules dendritiques empêchant ainsi leur maturation et perturbent leur capacité à stimuler les lymphocytes T [76].

L'IL-12 p70 a plusieurs fonctions biologiques durant l'infection par *Plasmodium*. Elle induit la production d'IFN- γ et de TNF- α qui jouent un rôle dans la réponse pro-inflammatoire [77]. L'IL-12p 70 active l'hématopoïèse, augmente la cytotoxicité des cellules NK, facilite la réponse de lymphocyte T CD8⁺ en plus de stimuler la production d'immunoglobulines, et induit la prolifération et la différenciation des lymphocytes T en cellules Th1 [77].

1.10 La réponse immunitaire adaptative lors de l'infection par *Plasmodium*

Quoique la réponse immunitaire innée soit efficace autant dans la prévention de l'infection que dans la réduction des pathogènes, la guérison complète ou le contrôle de l'infection par *Plasmodium* s'achève seulement lorsque l'immunité adaptative est induite [74].

La réponse adaptative du système immunitaire vis-à-vis d'un antigène dépend

de la reconnaissance de celui-ci par des lymphocytes B ou T dotés des récepteurs spécifiques à l'antigène et dont les interactions entraîneront la prolifération et la différenciation des lymphocytes naïves en lymphocytes T ou B effecteurs [78].

Dans des régions où la malaria est endémique, l'infection par *Plasmodium* induit une forte réponse humorale qui fait intervenir une production prédominante d'immunoglobuline IgM et IgG, dont un peu plus de 5% sont spécifiques aux antigènes de *Plasmodium*. Cette réponse intervient suite à l'activation des lymphocytes B par des voies dépendantes ou indépendantes de l'intervention de lymphocytes T [24, 25]. Les anticorps produits sont spécifiques aux antigènes exprimés à la surface membranaire des érythrocytes infectés. Les anticorps favorisent la neutralisation, l'opsonisation et la phagocytose des parasites libres (mérozoïtes) et des cellules infectées par les macrophages hépatiques et spléniques [14].

Suite à une première infection, la parasitémie est contrôlée par l'activation des lymphocytes B indépendants des lymphocytes T, tandis qu'une deuxième infection active les cellules B par la voie dépendante de cellules T CD4+ [14]. Ainsi, les lymphocytes B jouent alors un rôle-clé dans l'immunité contre l'étape intra-érythrocytaire de l'infection [79].

La réponse immunitaire à médiation cellulaire protège autant contre la phase pré-érythrocytaire que contre la phase intra-érythrocytaire de l'infection par *Plasmodium*. L'implication de deux sous groupes de lymphocyte T, les lymphocytes CD8+ et CD4+, est essentielle à cette protection [24, 25]. Les lymphocytes T détectent l'antigène lorsqu'il est associé à des molécules du CMH de classe I ou II exprimées à la surface des CPA (les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques) [80].

Les lymphocytes T CD8+ reconnaissent des antigènes de surface présentés par les molécules du CMH de classe I, ce qui amène soit à l'inhibition du développement intracellulaire des parasites ou à la lyse de la cellule hôte infectée [70].

Pour éliminer le pathogène intracellulaire, les cellules CD8+ qui réagissent

seulement durant la phase hépatique de l'infection étant donné que les érythrocytes n'expriment pas des molécules du CMH de classe I ou II, peuvent produire de l'IFN- γ ou lyser les cellules infectées par la voie perforine ou la voie dépendante de Fas [75, 77]. Les perforines créent des trous dans la membrane cellulaire de la cellule infectée permettant ainsi l'entrée de granzymes qui déclenchent ensuite l'apoptose [81, 82]. De ce fait, les lymphocytes T CD8⁺ jouent un important rôle défensif durant le stade pré-érythrocytaire de l'infection par *Plasmodium*.

Les lymphocytes T CD4⁺ ont une implication importante dans la protection immune contre la phase intra-érythrocytaire d'infection et leur mode d'action varie en fonction de l'espèce de *Plasmodium* murin utilisé [59]. Dans les modèles d'infection primaire par *P. c. chabaudi* et *P. c. adami*, ou secondaire par *P. vinckei*, la résolution de l'infection ne se fait qu'en présence de lymphocytes B qui assurent l'élimination des parasites. Lors des infections chez des souris déficientes en cellules B, la souris est capable de maintenir un bas niveau de parasitémie sans pour autant être apte à éliminer l'infection complètement. Par contre, lors des infections par *P. yoelii* et *P. berghei*, les cellules B sont essentielles dans la maîtrise de l'infection [25, 83].

Les lymphocytes T CD4⁺ se subdivisent en deux sous-groupes comprenant les lymphocytes T auxiliaires de type 1 (Th1) et les lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Th2). Ces deux groupes cellulaires ont des fonctions différentes tant par les cytokines qu'ils produisent que sur la réponse cellulaire qu'ils régulent [84, 86].

Les cellules Th1 sont caractérisées par une importante production d'IFN- γ , d'IL-2 et d'IL-12 par rapport aux cellules de type Th2. Elles activent les macrophages effecteurs et sont inductrices de la production d'IgG2a par les lymphocytes B [86]. Les cellules Th2 produisent de l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et sont médiatrices des réponses aux allergènes et des réactions d'hypersensibilité immédiate. Les cellules Th1 stimulent aussi la sécrétion des immunoglobulines IgM, IgG1, IgA et IgE par les lymphocytes B [86].

La différenciation d'une cellule Th0 (non différenciée) en Th1 et Th2 est

régulée par les CPA qui sont déjà polarisées en inductrices de Th1 ou Th2 [87]. Suite au contact avec des antigènes intracellulaires, les CPA secrètent de l'IL-12 qui dirige la polarisation des lymphocytes T naïfs en Th1, en inhibant aussi le facteur de transcription GATA-3 qui est nécessaire pour l'expression du phénotype Th2 [88].

D'autre part, des antigènes extracellulaires reconnus par les CPA, induisent la production d'IL-6 qui initie la maturation de lymphocyte Th2 avec l'aide d'IL-4 produit par les cellules NK, les mastocytes et les éosinophiles et les cellules T naïves [84]. Les cellules Th1 et Th2 ont des actions régulatrices les unes envers les autres: l'IL-10 baisse la production d'IFN- γ et d'IL-12 mais ne semble pas inhiber le TNF- α alors que l'IFN- γ inhibe les fonctions associées aux Th2 [86, 88].

Selon Taylor-Robinson *et al*, (1992), la contribution des cellules Th1 et Th2 dans le contrôle de la malaria change au cours de l'infection. Au début ou au pic de parasitémie, des lymphocytes T CD4⁺ de type Th1 sont importants tandis qu'après le pic d'infection, les cellules Th2 entrent en action en activant les cellules B productrices d'anticorps. L'IFN- γ est produit très rapidement au début de la parasitémie, détectable par des frottis sanguins, et se maintient jusqu'au pic d'infection, mais sa production chute suite à une production accrue d'IL-10 [89].

1.11 Les lymphocytes T et les récepteurs Tolls

Les récepteurs Tolls, découvert originalement chez la drosophile, ont permis la mise en évidence d'une famille de plus d'une dizaine de récepteurs apparentés à toll (Toll Like Receptor, TLR) chez l'humain et les rongeurs [90]. Outre le fait qu'on les retrouve exprimés par des cellules du système immunitaire, macrophages, polynucléaires, lymphocytes B et T, cellules dendritiques, les TLRs sont aussi présents sur des cellules ayant un contact avec le milieu externe tel que les cellules épithéliales pulmonaires, les cellules intestinales et les cellules de la peau [90].

Les TLRs répondent à une pléthore de motifs structuraux, associés spécifiquement aux pathogènes, appelés PAMPS (pathogen-associated- molecular patterns) et parmi les PAMPS, on retrouve les lipopolysaccharides (LPS), les lipoprotéines, les porines, les peptidoglycanes, les flagellines, de l'ARN double et simple brin et les oligonucléotides CpG non méthylés très fréquents chez les bactéries et les protozoaires [91].

Les TLRs sont classés en deux groupes en fonction de leur localisation cellulaire. Le premier groupe représenté par les TLRs 3, 7, 8, et 9, lesquels sont localisés dans des compartiments intracellulaires (endosomes), reconnaissent en particulier l'acide nucléique des agents infectieux. Un second groupe incluant les TLRs 1, 2, 4, 5, 6, tous présents sur la membrane plasmique des cellules hôtes réagissent avec des pathogènes extracellulaires [92].

Tous les TLRs partagent une façon similaire de signaler la présence de pathogènes dans leur environnement. Ce signal nécessite un domaine intracellulaire du récepteur Toll-IL-1 (TIR) situé dans le cytosol; ce domaine active une voie de signalisation commune aux TLRs qui conduit ensuite à l'activation de NF- κ B, des protéines kinases activées par des mitogènes, MAPK, ERK (extracellular signal regulated Kinase), JNK (Jun N-terminal kinase) ainsi que P38 [93].

L'activation des TLRs initie au moins deux voies de signalisation représentées dans la figure 2. La voie IRAK1 est dépendante de la molécule adaptatrice MyD88 (myeloid differentiation factor 88) tandis que la voie impliquant la signalisation par IKK est indépendante de MyD88. Tous les TLRs, à l'exception de TLR3, utilisent la voie MyD88. Cependant, son implication semble être plus ou moins importante pour chacun des TLRs [92].

La majorité des études portant sur les TLRs se sont surtout centrées sur leur rôle dans l'immunité innée. Comme les lymphocytes T expriment aussi des TLRs, plusieurs recherches ont ciblé leur implication dans l'immunité acquise. Les TLRs peuvent avoir des effets indirects ou directs sur les cellules T.

En effet, des études ont démontré que l'activation des CPA par les TLRs déclenche leur maturation en augmentant l'expression des molécules co-stimulatrices et des molécules du CMH tous en induisant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-12. La production d'IL-12 accroît la survie et la prolifération des lymphocytes Th1 ce qui a pour effet d'activer une réponse inflammatoire [94].

D'autre part, Komai-Koma *et al* (2004) ont suggéré que l'expression de TLR2 chez les lymphocytes T est dépendante de l'activation du récepteur des cellules T (TCR), le TLR2 jouant un rôle de co-stimulateur dans cette situation [93]. La stimulation du récepteur TLR2 en plus d'augmenter la spécificité de reconnaissance des antigènes, stimule aussi la production d'IFN- γ par les cellules Th1 et ceux en absence de stimulation par leur TCR. Cette induction faite appel à la voie MyD88/IRAK4 qui active le NF- κ B et l'ERK, tel qu'observé dans la réponse innée, ainsi que partiellement les JNK et P38. La production de l'IFN- γ est renforcée par l'IL-2 et l'IL-12 [95].

Le TLR2 favorise aussi la prolifération des lymphocytes Th1 et leur survie en stimulant la production des protéines anti-apoptotiques c-Myc et Bcl-X_L [95]. Toutefois, tout dépendant du ligand, le TLR2 peut aussi mettre en branle la réponse des lymphocytes Th2 par une production d'IL-10 et d'IL-13 chez les cellules dendritiques, réponse qui implique la voie ERK et c-FOS, ce dernier étant inhibiteur potentiel de la production de l'IL-12 par la voie P38 MAPK [96, 97].

Tout comme le récepteur TLR2, les récepteurs TLR3 et TLR9 sont exprimés chez les lymphocytes T CD4⁺ activés et leur expression stimule la survie des cellules T CD4⁺ activées par la voie NF- κ B en utilisant la protéine kinase IKK $\alpha\beta$ [94].

Des recherches ont montré que les souris MyD88 knock out (KO) sont plus susceptibles aux infections par les protozoaires *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* et *Leishmania major* et cette susceptibilité est associée à une faible production de cytokines pro-inflammatoires [84]. Lors d'une infection par

P. berghei NK65 ou *P. chabaudi*, on observe aussi une plus grande susceptibilité des souris MyD88 KO à la présence de parasite liée à une faible production de cytokines pro-inflammatoires [92, 98]. Néanmoins, le MyD88 n'est pas nécessaire à la résolution de l'infection par *P. chabaudi* et semble augmenter la pathologie inhérente à l'inflammation [92].

Une récente étude a dévoilé que la molécule d'ancrage glycosyl-phosphatidylinositol (GPI), glycolipide associé aux protéines de surface des mérozoïtes, est fortement reconnue par le TLR2 et en une moindre importance par TLR4. Le GPI de *P. falciparum* induit la production de TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-12 chez les macrophages murins ainsi que chez les monocytes de sang périphériques *in vivo* et *in vitro* [99].

Le GPI stimule la production de cytokines pro-inflammatoires par des voies de signalisation impliquant ERK, p38, JNK et NF- κ B [100].

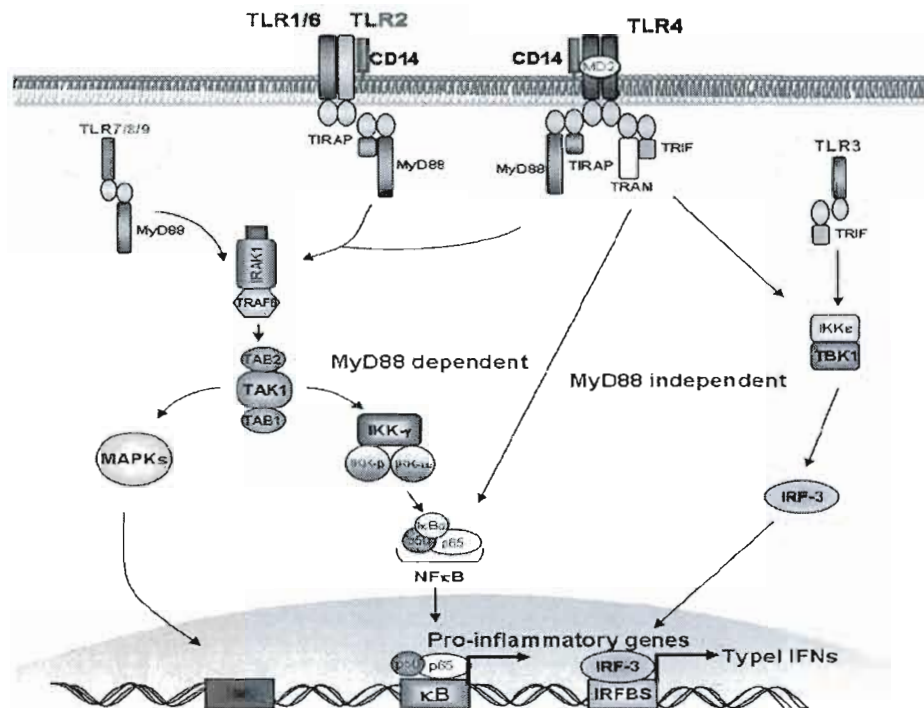


Figure 3: Voie de signalisation des TLRs. Tous les récepteurs TLRs, sauf TLR3, induisent la production de cytokines par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice MyD88. Les TLR 1, 2, 4 et 5 utilisent l'adaptateur TIRAP en association avec MyD88. Dans la signalisation MyD88 dépendante, les protéines CD14, MD-2 et TIRAP/Mal servent à recruter MyD88 aux récepteurs activés. Une fois liée au récepteur, MyD88 s'associe à IRAK-1 et IRAK-4, ce dernier phosphorylant le complexe suite à son activation. Les protéines TRAF6, TAK1, TAB1, TAB2 ainsi que TAB3 sont ensuite recrutées et fixées aux complexes déjà formés. TAK1 phosphoryle les complexes MAPK et IKK pour déclencher l'activation des plusieurs gènes. TLR3 et en moindre importance TLR4, utilisent une voie de signalisation MyD88-indépendante qui nécessite l'utilisation de la protéine adaptatrice TRIF/TICAM1, qui suite à l'activation du TLR se lie à la protéine adaptatrice TRAM/TICAM2 dans le cas de TLR4. La protéine TRIF associée à TLR3 ou TLR4 permet la production de l'IFN de type 1 suite à la fixation du complexe à la protéine kinase TBK1 qui induit la phosphorylation et la translocation de IRF3 au noyau.

Figure tirée de la référence [92].

1.12 Implication du facteur inhibiteur de la migration de macrophages (MIF) dans l'immunité innée et adaptative

Découvert en 1966, le facteur inhibiteur de la migration de macrophage (macrophage migration inhibitory factor, MIF) est une protéine de 12.5kDa que l'on peut retrouver sous forme monomérique, dimérique ou trimérique [101]. Le MIF exprimé autant par les cellules immunitaires que par des cellules non immunitaires, est produit par les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T, les lymphocytes B, les neutrophiles, les mastocytes, les basophiles et les cellules du système endocrinien (l'hypothalamus et la glande pituitaire) de manière constitutive. Il est emmagasiné dans la cellule suite à sa production et semble avoir un effet biologique seulement lorsque sécrété [102].

Le MIF est produit en réponse aux endotoxines, aux glucocorticoïdes et aux cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α [6]. Il est impliqué dans plusieurs maladies immunitaires et inflammatoires incluant, l'arthrite rhumatoïde, le choc septique et le cancer [101].

Peu de choses sont connues sur les voies impliquées dans l'induction de MIF. Les dernières études suggèrent l'existence d'un récepteur extracellulaire (CD74/CD44) et d'un récepteur intracellulaire (JAB1, Jun activation domain binding protein 1), ce dernier est un co-activateur de la transcription [101, 103].

Lors de la fixation du MIF à CD74/CD44, la voie de signalisation ERK1 et ERK2 (extracellular signal-regulated kinase 1, 2) est activée telle que décrite dans la figure 3. Cette activation conduit à la phosphorylation et l'activation d'une phospholipase A2 cytoplasmique (cPLA2), une enzyme essentielle dans la cascade de signalisation impliquant les cytokines pro-inflammatoires. La cPLA2 catalyse la production d'acide arachidonique connu comme étant activateur de

JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase (JNK)/stress activated protein kinase (SAPK)). Suite à l'activation d'ERK1/ERK2, le MIF inhibe les effets anti-inflammatoires des corticostéroïdes, et la sécrétion de la PGE2. Il inhibe l'activité apoptotique de la P53, semble impliqué dans la production de l'IL-12, du TNF- α , et agit aussi en synergie avec l'IFN- γ pour favoriser la sécrétion de NO [11, 4]. Le MIF augmente l'expression des TLR4 en agissant sur les facteurs de transcription de la famille ETS, incluant le PU.1 lequel est essentiel à la transcription du gène *tlr4* chez la souris [101, 102].

L'interaction du MIF avec JAB1 (JUN-activation domain-binding protein 1) permet l'activation de JNK qui à son tour phosphoryle JUN. Cette dernière est alors un co-activateur de la protéine activatrice 1, AP1 (activator protein 1), qui est un facteur de transcription impliqué dans la croissance, la transformation, la mort cellulaire et l'inflammation [5, 102, 104].

Comme pour les interactions entre MIF et CD74/44, la fixation de JAB1 induit plusieurs réactions telles que la dégradation de l'inhibiteur du cycle cellulaire KIP1, la dégradation de la P53 ainsi que l'inhibition exercée par JAB1 sur JNK et AP1 [105].

En plus de ces fonctions précédentes, le MIF induit l'expression de l'IL-2 et de son récepteur en plus de favoriser le développement de lymphocytes T mémoires et la différenciation Th1/Th2 [107]. Il est aussi impliqué dans la suppression de l'hématopoïèse dans la moelle osseuse ce qui semble participer à l'anémie durant la malaria [10, 12, 106].

En plus d'agir sur le système immunitaire inné, le MIF est aussi impliqué dans la réponse immune adaptative. Il est produit par les cellules Th0, Th1 et dans une plus grande proportion par les cellules Th2 lorsque celles-ci sont stimulées par des mitogènes [7]. Le MIF soutient l'activation et la prolifération de lymphocytes T et B *in vivo* en plus de favoriser la production d'anticorps [4, 7].

Chez la souris BALB/c, les anticorps neutralisant le MIF, inhibent les cellules

Th2, tout en promouvant les activités effectrices des cellules Th1, un changement qui aurait pour conséquence l'induction d'une réponse cellulaire inflammatoire impliquant l'activation des macrophages [107]. Une étude portant sur le rôle du MIF dans l'asthme suggère qu'en absence de MIF, la chute dans la production de cytokines de type Th2 est mesurée chez des souris immunisées avec de l'ovalbumine, ainsi qu'une réduction significative de la prolifération des lymphocytes T et de la sécrétion de l'IL-2 [106, 107].

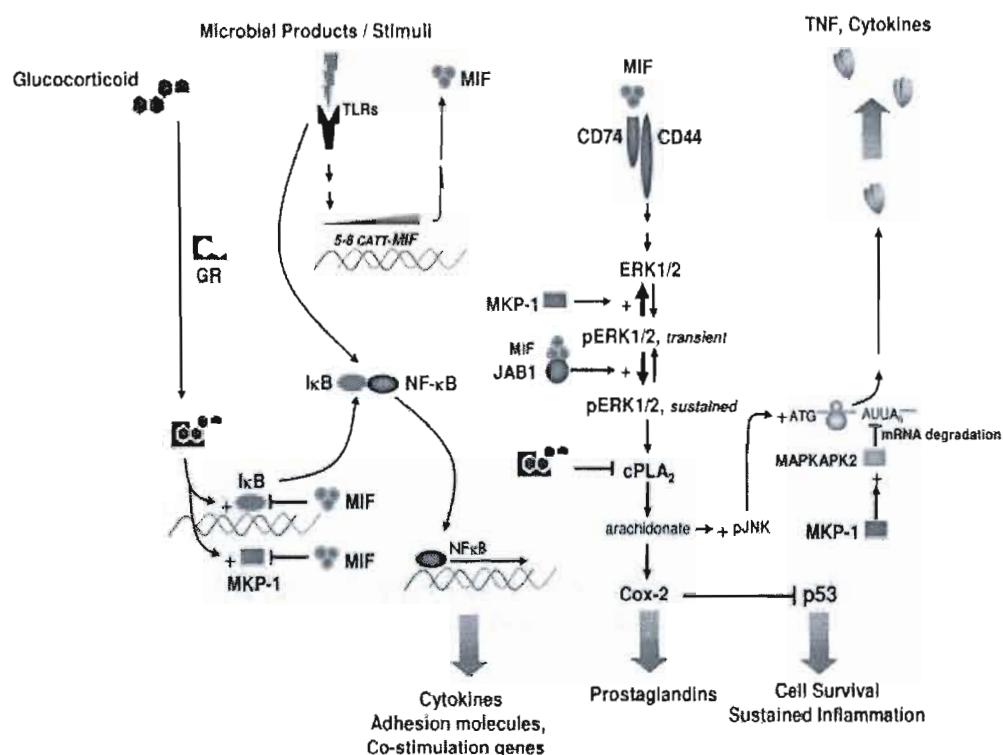


Figure 4: Voie de signalisation du MIF. Le MIF agit sur deux types de récepteurs extra et intracellulaire. La fixation du MIF extracellulaire à CD74/CD44 active ERK1 et ERK2 ce qui conduit à une cascade de signalisation impliquant JAB1. L'activation d'ERK1/2 amène à la production de prostaglandines, à l'inhibition de la P53 ainsi qu'à la production de cytokines pro-inflammatoires.

Figure tirée de la référence [107].

Une étude préliminaire de notre laboratoire suggère que lors de l'infection par *P. c. adami* (DK), une activation précoce de lymphocytes T a lieu, caractérisée par la production de l'IFN- γ et du TNF- α . L'activation des cellules T par la voie classique impliquant les molécules du CMH et les peptides antigéniques ayant lieu quelques jours plus tard, nous suggérons que les TLRs pourraient être impliqués dans cette réponse. Nous postulons que l'activation précoce des lymphocytes T pourrait être modulée par le MIF, étant donné que les splénocytes des souris traitées avec un anticorps anti-MIF produisent significativement moins d'IFN- γ et d'IL-10, manifestent des parasitémies plus faibles et ont une sécrétion plus élevée de TNF- α au début d'infection (fig. 5). L'auteur de l'étude, Benoit Bélanger [108], a suggéré que la voie de signalisation impliquant les MAPK P38 reste activée de manière soutenue et intensive lors de la neutralisation du MIF, ce qui pourrait expliquer la sécrétion accrue de TNF- α précoce. De plus, il suggère que durant l'infection avec *Plasmodium*, les GPI qui peuvent se lier aux récepteurs aux manoses et stimuler la production de TNF- α chez les macrophages, joueraient aussi un rôle dans la sécrétion accrue de TNF- α durant la neutralisation [108]. Dans le cadre de cette même étude préliminaire, suite à la neutralisation du MIF, les cellules NK ont déployé une activation déficiente et comme elles sont aussi impliquées dans la sécrétion de l'IFN- γ , il a été postulé que cette déficience pourrait expliquer la faible sécrétion de l'IFN- γ au début de l'infection suite à la neutralisation du MIF [35,108].

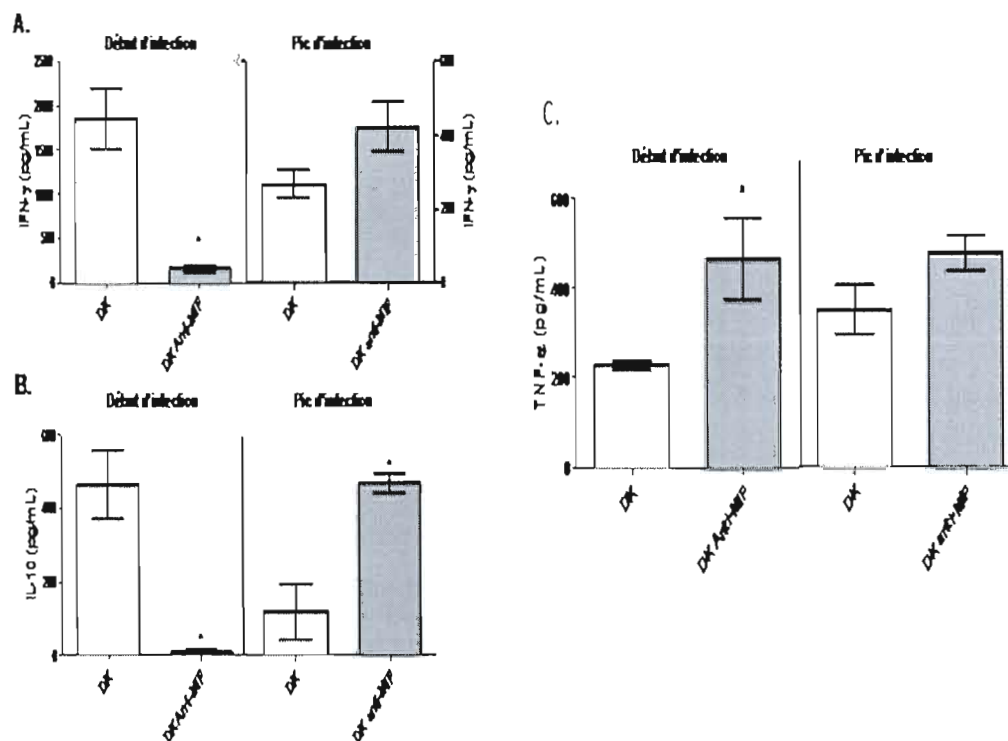


Figure 5: La neutralisation du MIF change le profil de sécrétion de l'IFN- γ , de l'IL-10 et du TNF- α . Les concentrations d'IFN- γ (A) et d'IL-10 (B) ont été mesurées après 72h dans un surnageant de culture des cellules spléniques totales sans stimulation. Une concentration de 2×10^6 cellules/ml a été utilisée. Les histogrammes représentent la moyenne \pm les erreurs standard à la moyenne de 4 souris par groupes. L'expérience a été répétée à deux reprises, et ce pour chacun des temps d'infection. Les analyses statistiques ont utilisé un t-test non paramétrique two-tailed. * $p < 0,05$.

Figure tirée de la référence [108].

1.13 Hypothèse et Objectifs

La présente recherche est une suite de l'étude préliminaire effectuée par Benoît Bélanger portant sur la neutralisation *in vivo* du MIF (par injection d'anticorps monoclonal neutralisants) chez les souris BALB/c suite à une infection par *Plasmodium chabaudi adami* DK [108]. La neutralisation du MIF semble aussi avoir une influence sur la résolution de l'infection ainsi que sur la pathologie liée à une parasitémie plus faible au pic de parasitémie au cours de l'infection. Plus précisément, les souris traitées avec l'anticorps neutralisant le MIF ont développé des parasitémies plus faibles et une anémie plus modérée. Nous avons émis l'hypothèse que ces améliorations ont été liées à une augmentation de la production d'IFN- γ en absence de MIF. Cette supposition se base sur le fait que la neutralisation de MIF augmente la sécrétion d'IFN- γ et la réponse CTL chez un modèle de cancer murin [119].

Nous nous proposons de vérifier cette hypothèse en utilisant des souris déficientes en MIF (MIF/KO) élevées à l'UQÀM, qui permettent une analyse plus efficace du rôle du MIF durant l'infection par comparaison avec des souris de type sauvage.

Pour ce faire, les objectifs que nous nous sommes fixés étaient de:

- a) Déterminer les populations cellulaires responsables de la production précoce et au pic de parasitémie de TNF- α , IFN- γ et IL-10 durant l'infection par *P. chabaudi adami* (DK).
- b) Évaluer l'effet de l'absence du MIF (des souris MIF/KO) dans la réponse des ces types de cellules sur la sécrétion des cytokines TNF- α , IFN- γ et IL-10.
- c) Corroborer l'effet de l'absence du MIF sur la cinétique d'infection ainsi que sur l'anémie en évaluant le niveau d'hémoglobine, de réticulocytes et de précurseurs de la série érythroïde.

De plus, les mécanismes de signalisation impliqués dans le changement du profil de

TNF- α et d'IFN- γ induit par l'absence de MIF via les récepteurs TLR ont aussi été étudiés en évaluant *ex-vivo* l'expression de TLR-4, TLR-2 et TLR-9.

CHAPITRE II

DÉMARCHE ET MÉTHODOLOGIE

2.1 Souris BALB/c.

Des souris BALB/c femelles âgées de 6-8 semaines (Charles River, Canada) ainsi que des souris BALB/c déficientes en MIF (en provenance d'Ohio State University et présentement élevées à l'UQAM) ont été utilisées dans cette étude. Pour déterminer le phénotype et les fonctions des cellules impliquées dans la production de TNF- α et d'IFN- γ en absence de MIF, deux groupes de huit souris ont été utilisés pour l'infection. Des groupes de souris contrôles (sans infection) de chaque catégorie (type sauvage et MIF/KO) ont aussi été évaluées.

Le premier groupe infecté constitué des souris BALB/c de type sauvage. Le deuxième groupe infecté comprend de souris déficientes en MIF (MIF/KO). Les souris MIF/KO ont été générées par recombinaison homologique et ont été par la suite croisées avec une souche pure de souris BALB/c.

2.2 Infection des souris BALB/c par *P. chabaudi adami*.

Pour les groupes de souris infectées, les souris ont reçu 10000 érythrocytes parasités par *P. c. adami* dans 200 μ l de solution physiologique saline (PBS). Cette inoculation a été faite par la voie intra-péritonéale à l'aide d'une seringue de 1 ml équipée d'une aiguille de calibre G27. Lorsque la parasitémie a été de 1 à 2% (phase précoce

d'infection) et 15 à 20% (pic d'infection), quatre souris infectées de chaque groupe ont été euthanasiées par inhalation de CO₂ en même temps que quatre souris naïves et leurs rates ont été prélevées. Un marquage intra et extracellulaire pour les cytokines, les récepteurs TLR et des tests ELISAs ont été effectués sur les splénocytes totaux isolés.

2.3 Préparation des cellules de la rate.

Les rates prélevées chez les souris ont été déposées dans un pétri contenant 5ml de milieu RPMI 1640 contenant du β -mercaptoéthanol à une concentration de 0,0034%. Par la suite, elles ont été homogénéisées et transférées dans des volumes finaux de RPMI de 10ml qui ont été centrifugés pendant 10 minutes à 1200 rpm.

Les surnageants décantés, les culots ont été resuspendus dans 1ml de tampon de lyse de globules rouges (red blood cell lysing buffer) (Sigma, St-Louis, Missouri, USA), incubés pendant 3 min suivi d'un lavage avec 9ml de RPMI pendant 10 minutes à 1200 rpm. Finalement, la concentration des splénocytes a été ajustée à un million de cellules par tubes FACs par un compte cellulaire suite à une coloration au bleu de Trypan (Sigma, St-Louis, Missouri, USA) pour déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire.

2.4 Détermination de la cinétique d'infection.

À partir du troisième jour d'infection, la parasitémie a été quotidiennement mesurée à l'aide de frottis sanguins colorés au réactif de Giemsa (Sigma, St-Louis, Missouri, USA) dont le compte a été effectué par microscopie optique.

2.5 Dosage de l'hémoglobine.

Des mesures d'hémoglobine ont été effectuées un jour avant l'infection et le jour du sacrifice. Deux microlitres de sang ont été pris par la queue de la souris, mis dans 500 μ l du réactif de Drabkin (Sigma, St-Louis, Missouri, USA) et incubés à température pièce au moins 15 minutes avant d'être lu à 540nm. Le standard (hémoglobine de rat, Sigma, St-Louis, Missouri, USA) a été utilisé en partant d'une concentration de 180mg/ml et en réalisant 4 dilutions selon les indications stipulées par le manufacturier du réactif de Drabkin. Deux microlitres ont été mélangés à la solution de Drabkin.

2.6 Détermination des réticulocytes sanguins.

Deux microlitres de sang ont été prélevés par le bout de la queue, dans 300 μ l de PBS, et ce, pour chaque souris, un jour avant l'infection et le jour de sacrifice. La suspension a été ensuite centrifugée à 1200 rpm durant 10 minutes et le surnageant a été éliminé. Le culot a été mis en suspension dans 0,250ml d'une solution de glutaraldéhyde 0,025% afin de fixer les cellules qui ont été conservées à 4°C pour une nuit. Le jour de l'analyse, le glutaraldéhyde a été dilué avec 1ml de PBS et centrifugé (étape de lavage). Les cellules ainsi lavées ont été mises en suspension dans 500 μ l de PBS contenant 1 μ l d'anti-CD71 (clone 217.1.4) conjugué à l'isothiocyanate fluorescente (FITC) (Cedarlane, Burlington, Canada). Les tubes ont été incubés à 4°C dans le noir durant 40 minutes. Finalement, les cellules ont été lavées avec du PBS et mises en suspension dans 1ml de PBS pour être analysées au cytofluoromètre de flux (FACScan) (Becton Dickinson, Oakville, Canada).

2.7 Marquage de la série de précurseurs érythroïdes.

Un million de cellules de la moelle osseuse et de la rate, ont été mises en suspension dans du tampon PBS contenant 2% de fœtal, bovin serum (FBS). Les différents précurseurs érythropoïétiques comprenant les proérythroblastes (ProE) (TER 119 low, CD71 high, FSC high), les érythroblastes basophiliques précoces (EryA) (TER 119 high D71 high FSC high), les érythroblastes basophiliques tardifs et polychromatiques (EryB) (TER 119 high, CD71 high, FSC low), les érythroblastes orthochromatiques ainsi que les réticulocytes (EryC) (TER 119 high CD71 high FSC low), ont été quantifiés par marquage extracellulaire à l'aide des anticorps anti-CD71 (FITC) (clone 217.1.4) et ou anticorps anti-Ly76 (clone TER 119) (PE) (Cederlane, Burlington, Canada). Les cellules isolées de la rate ou de la moelle osseuse ont été incubées durant une période de 40 minutes à 4°C en présence des différents anticorps nommés ci-dessus. Par la suite, elles ont été lavées et resuspendues dans une solution de PBS pour une lecture au FACScan (Becton Dickinson, Oakville, Canada). Les données ont été analysées avec le logiciel WinMDI version 2.6.

2.8 Détermination de l'expression de TLR2 et 4.

Le niveau d'expression des récepteurs TLRs a été déterminé chez les souris naïves, les souris infectées de type sauvage ainsi que les souris déficientes en MIF. Pour cela, des splénocytes totaux ont été isolés et les récepteurs TLR2 et TLR4 ont été analysés par marquage avec des anticorps de surface spécifiques anti-TLR2 couplés au fluorochrome Allophycocyanin (APC) et anti-TLR4 couplés au fluorochrome ALEXA 647 (eBiosciencce, San Diego, USA). Un co-marquage avec des anticorps

anti-CD90 PE (cellules T) et antiF4/80 couplés au Peridinin chlorophyll protein (PERCEP) (macrophages) a permis de quantifier le niveau d'expression de TLR4 et TLR2 chez ces deux populations cellulaires par FACscan.

2.9 Analyses statistiques.

Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA non paramétrique quand trois groupes ou plus sont comparés, ou avec un T-test non paramétrique si deux groupes d'au moins cinq données individuels sont comparés.

DESCRIPTION DE L'IMPLICATION DE L'ÉTUDIANTE DANS LES TRAVAUX ET LA RÉDACTION DE L'ARTICLE.

Cette étude a eu besoin d'un travail en équipe entre moi même, ma superviseure et les autres co-auteurs. J'ai réalisée toutes les manipulations *in vivo* (infections, prélèvements sanguins) ainsi que les dosages des réticulocytes et de l'hémoglobine. J'ai réalisé trois de quatre expériences de polarisation, le Western Blot de GATA3 et T bet ainsi que les dosages d'ELISA. François Desautels a réalisé les PCR de T bet et GATA3, et Karine Kelendji, stagiaire sous ma co-supervision, a réalisée deux expériences de prolifération en absence de polarisation. Suite a une discussion et l'analyse concertée de résultats avec ma superviseure, cette dernière a prit en charge la rédaction de l'article ainsi que les expériences nécessaires pour son acceptation finale. M. Sanchez Dardon a réalisée une de quatre expériences de polarisation, et le Dr. Satoskar a fourni les souris MIF KO.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3. ARTICLE: MIF: a down-modulator of early T cell-dependent IFN γ responses in *Plasmodium chabaudi adami* (DK) infected mice.

Tshikudi Malu Diane, Desautels François, Kelendji Karine, Jaime Sanchez Dardon, Satoskar Abhay & Scorza Tatiana.

3.1 Abstract

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a cytokine involved in delayed type hypersensitivity and inflammatory responses, with a plausible regulatory role in T cell activation, as its neutralization enhances anti-tumor cytotoxic T lymphocytes and decreases T cell-dependent antibody responses *in vivo*. Since IFN- γ secretion by CD4⁺ T cells is pivotal for the resolution of malaria and since MIF secretion is readily induced during *Plasmodium chabaudi adami* DK blood-stage infection, the effect of MIF neutralization/deficiency on the infection kinetics with this parasite was investigated. Primary infections with *P.c. adami* DK parasites were more efficiently controlled in MIF-neutralized and MIF knock-out (KO) mice, which developed lower cumulative and peak parasitemia. Impaired IL-4 responses mainly from non-T and

non-B cells were measured in MIF KO mice through-out patent infection, and at day 4 post-infection, higher absolute numbers of activated CD4⁺ cells were found in MIF KO mice, which secreted more IFN- γ , less IL-4 and less IL-10 than wild type cells. Enhanced secretion of IFN- γ and impaired production of IL-4 were also confirmed in CD4⁺ T cells from naïve MIF KO mice when stimulated *in vitro* without or with recombinant IL-12 to induce T_H1 polarization. However, MIF KO CD4⁺ efficiently acquired a T_H2 phenotype when stimulated in the presence of IL-4, suggesting normal responses to IL-4/STAT6 signaling. As naïve CD4⁺ T cells from MIF KO mice express higher Tbet/HPRT ratios than WT cells, our data indirectly suggests that MIF may inhibit the intrinsic capacity of CD4⁺ T cells to secrete type 1 cytokines and to differentiate into T_H1 cells by down-regulating T-bet expression. Thus, in an environment poor in IL-4, over-expression of T-bet in MIF KO T cells may further favor T_H1 differentiation and provide more efficient control of primary malaria infection.

3.2 Introduction

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a pleiotropic cytokine secreted among others by activated T cells and macrophages (1-3), and playing a center role in inflammation, delayed type hypersensitivity (DTH) reactions (4, 5) and angiogenesis(6). MIF counter regulates the anti-inflammatory effects of glucocorticoids (7), enhances phagocytosis and H₂O₂ production in macrophages and synergizes with IFN- γ to up-regulate nitric oxide (NO) production (8). Accordingly, impaired pro-inflammatory responses are measured in MIF-deficient macrophages, which seems partially concurrent to impaired expression of Toll-like receptor (TLR)-4 and NF- κ B activation (9). Although MIF is expressed constitutively, its secretion is

further induced by various stimuli including oxidative stress, cytokines and infection (10).

MIF was initially described as a soluble mediator secreted by activated T cells to inhibit the migration of macrophages and thus contributes to DTH reactions(4, 5). Interestingly, although expressed by resting T_H1 and T_H2 cell, release of MIF in response to ConA stimulation has been solely demonstrated in T_H2 clones(1). Several effects have been associated to MIF neutralization on mouse responses to immunization. *In vivo* neutralization of MIF markedly inhibits antigen-specific proliferation of splenic T cells as well as antibody responses (11), suggesting its involvement in the modulation of T cell immunity and T cell-dependent antibody responses. Accordingly, MIF associates to T_H2 inflammatory pathologies as asthma and experimental allergic reactions (12, 13) and seems essential for the control of helminthic infections relying on T_H2 effector immunity (14). In agreement with its apparent involvement in T_H2 cell development, *in vivo* neutralization of MIF enhances CTL responses in mice bearing OVA-transfected EG.7 tumours and further increases specific IFN- γ and CTL responses *in vitro* (11).

MIF has been recently involved in the pathology associated to malaria (15), a parasitic disease characterized by systemic inflammation and inherent cerebral complications and anaemia (16, 17). Specifically, an inhibitory effect has been reported for MIF on the growth and differentiation of erythroid progenitors (18), an effect that is also conferred by TNF- α (19). Martiney *et al.* measured enhanced release of MIF in mice with *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection, associating inhibitory effects to this cytokine on the differentiation of erythroid progenitors (20), and MIF has been shown to synergize with IFN- γ and TNF- α in the inhibition of erythropoiesis (18). Although high plasmatic levels of MIF correlate with the severity of cerebral and placental malaria (21, 22), its role in cytokine-driven malarial anaemia in humans remains conflicting (23-25).

In vitro treatment of monocytes and macrophages with *Plasmodium*-infected RBC and

with the malarial pigment hemozoin induces robust secretion of MIF(20) and in our laboratory, *in vivo* administration of synthetic hemozoin dramatically increased MIF levels in the serum of naïve BALB/c mice (unpublished results). Thus, through its ability to induce release of MIF, hemozoin contributes to the severity of malarial anaemia (18). In this context, milder anaemia and enhanced survival to lethal *P. c. chabaudi* AS infection were measured in MIF-deficient (MIF KO) mice backcrossed into the BALB/c genetic background when compared to wild type susceptible BALB/c mice (18) and in this infection model, severe anaemia is a major factor for morbidity as transfused mice are able to survive and resolve infection(26, 27). However, MIF deficiency did not affect IFN- γ nor TNF- α responses in *P.c. chabaudi*-infected mice, but substantially improved bone marrow erythropoiesis and increased the haemoglobin levels (18).

Blood stage murine malaria is characterized by the induction of T_H1 and T_H2 responses (28, 29) and in and in this context, the self-resolving *P.c. adami* DK model in BALB/c mice is particularly useful to study cell-mediated parasite killing since early IFN- γ production by CD4⁺ T cells is pivotal for the control of primary parasitemia (30). Indeed, administration of IFN- γ delays the onset of patent infection (31), and vaccines inducing IFN- γ responses significantly reduce peak and cumulative parasitemia (32). In addition, a T_H2 response is progressively induced at peak infection and is responsible for complete resolution of parasitemia (28), but the mechanism involved in the switch from T_H1 to T_H2 immunity remains unknown.

Considering the regulatory effects associated to MIF on CTL and IFN- γ responses *in vivo* and *in vitro*, we investigated the effects of its deficiency on the kinetics of infection with non-lethal *P.c. adami* DK parasites. Our data indirectly suggests a role for MIF in the down-regulation of IFN- γ and up-regulation of IL-4 responses in CD4⁺ T cells at early infection, indicating that this versatile cytokine also modulates CD4⁺ T cell adaptive responses.

3.3 Material and Methods

3.3.1 Parasite, mice and infection

Four to six weeks old female wild type (WT) (Charles River, Canada) and female MIF KO BALB/c mice (bred at the animal facility of the University of Quebec in Montreal) were infected with 10^5 *P. c. adami* DK (556 KA) parasitized RBC by the intraperitoneal route. Parasitemia was measured daily in methanol fixed tail blood smears stained with a 10% Giemsa solution in PBS. The study was conducted in compliance with the regulations from the Animal Committee of the University of Quebec in Montreal.

3.3.2 Cell purification and culture

Single-cell suspensions of splenocytes from naive and *P. c. adami* DK infected mice (days 4, 8 and 12 post-infection) were prepared, RBC were lysed in Red Blood cell Lysing Buffer Hybri-max (Sigma Aldrich, USA) and spleen white blood cells were cultured in complete media (RPMI-1640 supplemented with 10% FBS, 1% HEPES, penicillin and streptomycin, Invitrogen, USA) at a concentration of 4×10^6 cells/ml in 24 well plates (Saarstedt, Canada). In experiments assessing the contribution of CD90⁻ lymphocytes in the cytokine response, CD90⁺ cells were removed using the EasySep® Mouse CD90⁺ positive selection kit (StemCell Technologies, Canada). CD4⁺ T cells were enriched by negative selection using the EasySep® Mouse CD4⁺ T cell enrichment kit (StemCell Technologies, Canada). Purity levels were $\geq 95\%$.

3.3.3 Quantification of activated CD4⁺ T cells and IFN- γ , TNF α , IL-4 and IL-10

Splenic cells were recovered from WT and MIF KO mice at day 4 of infection and were labeled with anti-CD4- FITC and anti-CD69 PERCP monoclonal antibodies for estimation of absolute numbers of activated CD4⁺ T cells in the spleen.

Concentrations of IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-10 were measured in 48h cultures of total splenocytes, CD4⁺ T cells and CD90⁺ lymphocytes from naive and infected mice without further stimulation using specific MAXTM Set (Deluxe) ELISA kits (BioLegend, USA). IFN- γ and IL-4 were also assessed in 48h culture supernatants from CD4⁺ T cells (4×10^6 cells/ml) from WT and MIF KO mice, stimulated with membrane bound anti-CD3 (1.5 μ g/ml; clone C363.29B, Cedarlane Laboratories, Canada) and soluble anti-CD28 (1.5 μ g/ml; clone 37.51, Cedarlane Laboratories, Canada) antibodies.

3.3.4 Estimation of T-bet and GATA3 expression by RT-PCR

Total RNA was isolated from WT and MIF/KO CD4⁺ T cells from naive and *P. c. adami* (DK) infected mice with TRIzol reagent following the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized with 10 μ l of total RNA and the extension was made with 10 mM of dNTP SuperScript II (Gibco BRL, Rockville, MD). The PCR amplification of cDNA was made in a final volume of 50 μ l containing 0.5 μ g of template DNA, 1 unit of Taq polymerase (Genscript, New Jersey, USA) and 20 μ M of specific primers. Cycling condition were 94°C for 3 minutes, 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 30 cycles and 72°C for 7 minutes (geneAmp 9600 PCR system, Perkin-Elmer, Norwalk, CT). The sequences of the specific

primers used in this study were for T-bet sense 5'TGCCTGCAGTGCTTCTAACA 3' and antisense 5'TGCCCCGCTTCCTCTCCAACCAA 3'.

For GATA-3 sense 5' GGTTGAAGGAGCTGCTCTTG 3' and antisense 5'CTGGAGGAGGAACGCTAATG 3' (Integrated DNA Technologies, Inc, Iowa, USA). All PCR products were resolved by 2% agarose gel electrophoresis and visualized by staining the gel with ethidium bromide.

3.3.5 CFSE labeling of CD4⁺T cells

CD4⁺ T cells from naïve WT and MIF KO mice were labelled with 10 μ M carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies, USA) for 8 min, after which an equal volume of cold FCS was added to block the reaction. Following 15 min of incubation on ice, the cells were washed exhaustively in cold RPMI and were immediately stimulated.

3.3.6 Measurement of CD4⁺ T cell proliferation

CFSE-labeled CD4⁺ T cells or unlabelled CD4⁺ T cells from WT and MIF KO naïve mice were plated at a concentration of 4×10^6 cells (500 μ l per well) in 48 well plates (Sarstedt, Canada) previously coated with anti-CD3 monoclonal antibody and anti-CD28 antibody was immediately added. The mitotic events of CFSE-labeled T cells were analyzed 48h later using a FACSScan and the ModFit LT Software. In experiments using unlabelled CD4⁺ T cells, supernatants from cell cultures were recovered 48h later and replaced with complete media (500 μ l). Twenty five microliters of the combined tetrazolium compound (MTS) and the electron coupling

reagent, phenazine methosulfate (PMS) (Cell Titer 96 aqueous non-radioactive cell proliferation assay, Promega, USA) were then added and absorbance at 490nm corresponding to the dehydrogenase enzyme activity found in metabolically active cells, was measured 4h later in a BioRad Model 550 microplate reader.

3.3.7 Detection of MIF and transcriptional factors expression by Western Blot

For SDS-PAGE, 15% polyacrylamide gels were used. For the analysis of MIF in sera, 10 μ l of non diluted sera were deposited into individual wells. Recombinant MIF (R&D systems) was used as positive control. For the detection of MIF in Western blots, a 1:200 dilution of a rabbit anti-mouse MIF polyclonal antibody (Biosource) was incubated over night, after which the membranes were further incubated with a 1:3000 dilution of a bovine anti Rabbit IgG biotinylated antibody. Following incubation with Streptavidin-peroxidase (1:2500 dilution), a chemiluminiscent substrate (Pierce) was used to develop the reaction.

T-bet, Gata3 and B-actin protein expression were detected in CD4⁺ T cells purified from naïve MIF KO and WT mice without or with stimulation for 48h with plate bound anti-CD3 antibody and soluble anti-CD28 antibody. Supernatants were removed for analysis by ELISA, and cells were directly lysed in Laemli Buffer (BioRad Laboratories), after which proteins were separated in SDS-PAGE as described above. The transcriptional factors T-bet and Gata3 were detected using specific polyclonal antibodies (Santa Cruz technologies, USA) and secondary antibodies conjugated to peroxidase.

3.3.8 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a non parametric Student Test for the comparison of parasite burden and cytokine responses between WT and MIF KO cells or mice using the Prism Software.

3.4 Results

3.4.1 Parasitemia is significantly decreased in MIF KO BALB/c mice infected with *P.c. adami* DK parasites and associated to enhanced IFN γ responses and decreased IL-10 and IL-4 responses.

As mentioned previously, the *P.c. adami* DK/BALB/c mice model is suitable to study the interactions between macrophages and T cells involved in parasite elimination and their modulation by MIF, as its secretion is readily induced during infection (Fig. 1A). We monitored the progression of parasitemia in MIF deficient (KO) mice (Fig. 1B). MIF deficiency led to drop in peak and cumulative parasitemia (Fig. 1 C, D) and the inhibitory effect on patent parasitemia was evident at day 4 of infection (Fig. 1E). Considering the significant drops in cumulative parasitemia measured in MIF KO mice at early infection (day 4) in two independent experiments, we evaluated IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-10 responses at day 4 post-infection in two independent experiments. For this, total splenic cells were harvested from infected WT and MIF KO mice and CD4⁺ T cells were further purified by negative selection and in parallel, CD90⁻ cells were also enriched by magnetic removal of CD90⁺ T cells, to estimate the contribution for non-T cells in these responses. Although comparable concentrations

of IFN- γ were measured in cultures from total WT and MIF KO splenic cells in two independent experiments, its levels significantly increased in culture supernatants from purified CD4⁺ T cells from MIF KO mice (Fig. 2A; $p < 0.05$). The IFN- γ content in culture supernatants from CD90⁻ cells was relatively low and comparable in MIF KO and WT mice suggesting that CD4⁺ T cells are major source for IFN- γ at this time point of infection. In contrast to IFN- γ responses, TNF- α concentrations were comparable in total spleen, CD4⁺ and CD90⁻ cell cultures from WT and MIF KO mice (Fig. 2B), but IL-10 levels were significantly lower in total splenic cells and CD4⁺ T cell cultures from MIF KO mice (Fig. 2C). Infection was allowed to progress in a remaining group of mice until day 8, corresponding to peak parasitemia, and at this time point, comparable IFN- γ responses were measured in WT and MIF KO mice (Fig. 2D), whereas TNF- α secretion by CD4⁺ T cells from MIF KO mice was significantly enhanced (Fig. 2E). IL-10 responses by total splenic cells remained relatively lower in MIF KO infected mice at peak infection, albeit being comparable for WT and MIF KO CD4⁺ T cells and WT and MIF KO CD90⁻ cells when cultured separately (Fig. 2F),

In contrast to the enhanced IFN- γ response measured in CD4⁺ T cells from MIF KO mice at early infection, IL-4 responses were significantly low both for total splenic cells and purified CD4⁺ T cells from these mice (Fig. 3A), and interestingly this cytokine was shown to be majorly produced by cells others than CD4⁺ T cells (Fig. 3), CD90⁺ cells or B cells (data not shown). Production of IL-4 remained relatively low in MIF KO mice at day 8 of infection, and was associated to cells others than CD4⁺ T cells (Fig. 3B). IL-4 was still detected in culture supernatants from total splenic cells from WT and MIF KO mice 4 days after resolution of infection and remained relatively lower in MIF KO mice (Fig. 3C) and at this infection time point, IL-4 responses by CD4⁺ T cells were not detectable by ELISA.

Compared to WT mice, increased percentages and absolute numbers of splenic CD4⁺

expressing CD69 were measured in MIF KO mice at day 4 post-infection (Fig. 4 A, B, respectively) and interestingly, although higher absolute numbers of splenic CD4⁺ T cells were measured in naïve MIF KO mice compared to WT mice, no differences were noticed at day 4 post-infection (Fig. 4C). An additional interesting difference was also measured in respect to T-bet/GAPDH gene expression (Fig. 5A) and T-bet/GATA3 mRNA ratios which were relatively higher in CD4⁺ T cells from naïve MIF KO mice, although these differences disappeared in CD4⁺ T cells harvested four days after infection (Fig. 5C).

3.5.2 MIF KO CD4⁺ T cells have increased capacity to proliferate and secrete more IFN- γ and less IL-4 *in vitro*.

Taken together, our experiments revealed higher numbers of CD4⁺ T cells in MIF KO naïve mice, expressing higher ratios of T-bet/HPRT and T-bet/GATA3 (Fig. 6 A-C). In order to evaluate whether differences in IFN- γ and IL-4 responses were evident following short-term *in vitro* stimulation, CD4⁺ T cells from WT and MIF KO were purified by negative selection and were either labelled with CFSE prior to stimulation for 48h, or directly stimulated for 48h with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies and treated with MTS reagent for the last 4h, for estimation of metabolic activity. In parallel, culture supernatants were recovered and assessed for IFN- γ content by ELISA. Higher stimulation indexes were measured in MIF KO CD4⁺ T cells compared to WT cells in three independent experiments (Fig. 6 A-C) and comparable effects were measured with the MTS assay (Fig. 6 D). Western Blot analysis of T-bet confirmed its relatively higher expression in MIF KO naïve CD4⁺ T cells when compared to WT cells, whereas GATA3 was undetectable in resting cells (Fig 6E). Following stimulation, T-bet and GATA3 levels were comparable in WT and MIF KO

CD4⁺ T cells (results are representative of two independent experiments). IFN- γ secretion was significantly enhanced in MIF KO CD4⁺ T cells in response to TCR stimulation (Fig. 6F), suggesting that in absence of MIF CD4⁺ T cells proliferate better and secrete more IFN- γ . Interestingly, under the stimulation conditions assessed, CD4⁺ MIF KO-stimulated cells secreted significantly lower amounts of IL-4 (Fig. 6G). When MIF KO CD4⁺ T cells were cultured in the presence of recombinant IL-12 to induce T_H1 differentiation, a more robust T_H1 phenotype was induced in these cells, since relative to WT cells, higher IFN- γ levels (Fig. 7A) and lower IL-4 levels (Fig. 7B) were measured in culture supernatants from stimulated MIF KO CD4⁺ T cells. However, MIF KO CD4⁺ T cells responded efficiently to T_H2 commitment, as they secreted significantly less IFN- γ (Fig. 7C) and more IL-4 (Fig. 7D) than WT controls.

3.5. Discussion

The progression of blood stage *P.c. adami* DK infection and cytokine responses in CD4⁺ T cells were studied in MIF deficient mice. In BALB/c mice, primary infections with *P.c. adami* DK parasites are self-controlled and characterized by patent parasitemia from day 3 post-infection which resolves 12-15 days later. It is assumed that the primary wave of infection is majorly controlled by CD4⁺ T cells (33-35) and that early activation of T_H1 cells confers protective immunity (30), as IFN- γ induces reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNI) and nitric oxide (NO) production in macrophages which have detrimental effects on *Plasmodium* development (36). Our interest in studying the effects of MIF neutralization/deficiency during *P.c. adami* infection was driven by several indications of a regulator role for MIF on T cell activation. MIF is constitutively expressed in T cells and is secreted in response to mitogens or antigens (1), and its neutralization enhanced CTL responses

and IFN- γ secretion in a murine model of cancer (11). In addition, MIF seems essential for the control of *Schistosoma japonicum* infection, which is a parasitic disease requiring T_H2 responses (14). We therefore hypothesized that by modulating T helper cell differentiation and favouring the development of T_H2 cells, MIF should intervene in determining the fine balance between T_H1 and T_H2 effector responses necessary for efficient control of *P.c. adami* DK parasitemia. In this context, T_H1 responses are pivotal for the control of primary infection whereas T_H2 responses subsequently eliminate the remaining parasites and promote antibody-dependent control of secondary infections (29). Accordingly, IFN- γ is induced at early infection with *P.c. adami* DK parasites in resistant mice (30), and vaccines triggering IFN- γ responses significantly inhibit peak and cumulative parasitemia (32). Furthermore, administration of recombinant IFN- γ delays the onset of *P.c. adami* DK parasitemia in CBA mice, suggesting that the early presence of this cytokine is indeed protective (31). In contrast, T_H2 responses are accentuated at the early phase of infection in susceptible mouse strains (28, 37).

Secretion of MIF was corroborated in *P.c.adami* DK-infected mice and its neutralization or deficiency decreased peak and cumulative parasitemias. As early IFN- γ responses by CD4⁺ T cells were enhanced in MIF deficient mice, we hypothesize that the lower parasite burden measured in these mice is concurrent to its enhancement. In parallel, drops in IL-10 were measured at early and peak infection in MIF deficient mice which may be due to milder inflammation considering the pro-inflammatory effects associated to MIF. Relatively lower IL-4 responses were measured in MIF KO mice through-out patent infection and interestingly, cells other than T cells or B cells were major sources for IL-4, and their response was modulated by MIF. In this context, Helmby et al. (38) described a population of non-B non-T cells, suggested to be mast cells or cells of basophil origin as a major source for IL-4 during *P. chabaudi* AS infection (38) and in accordance with our results, production of

IL-4 was shown to increase at peak infection. Thus, our data indirectly suggests that MIF stimulates IL-4 responses in mast cells and basophils as well as in CD4⁺ T cells at early infection. The potential regulatory role for MIF on IL-4 responses in mast cells and basophils and T_H2 skewing in malaria is interesting as these cells, majorly linked to acute inflammatory reactions to allergens, are now being considered as crucial inducers of T_H2 responses (39).

The contrasting effects of MIF deficiency in lethal *P.c. chabaudi* AS infection, for which no effects on parasitemia but increased survival were measured in MIF KO mice (18) with our data with the non-lethal *P.c. adami* DK parasites indicates that additional factors besides T_H1 versus T_H2 tuning are involved in parasite virulence. Indeed, relative to *P.c. adami* DK infections, release of MIF is significantly enhanced during infection with the virulent *P.c. adami* DS strain, and lethality in this infection model associates to the development of a relatively weak T_H1 response and a stronger T_H2 response at early infection and to rapid multiplication of parasites (40). Although milder anaemia and decreased cumulative parasitemia were measured in MIF KO mice with lethal DS infection, their death was only delayed for 24h when compared to WT mice (data not shown).

Although cytokines control the outcome of T helper cell immunity, with IL-12 promoting T_H1 development through signal transducer and activator of transcription (STAT)4 and IL-4 favouring T_H2 differentiation through STAT6, it is still unclear whether these cytokines instruct cells to adopt specific T_H phenotypes or rather act as growth signals to sustain pre-determined T helper fates. In this context, ectopic expression of T-bet, the master transcriptional factor in T_H1 development seems sufficient in inducing IFN- γ signalling, and enhancement of IFN- γ expression by IL-12 seems only a secondary event (41). In our study, higher basal ratios of T-bet/HPRT and T-bet/GATA3 mRNA ratios were measured in naive MIF KO CD4⁺ T cells, differences that were however attenuated during infection and a comparable phenotype was measured for CD4⁺ T cells stimulated *in vitro*. The fact that MIF KO CD4⁺ T cells

develop a more robust T_H1 phenotype when stimulate in the presence of IL-12 than WT cells, which secrete relatively higher amounts of IL-4 (when cultured in absence of anti-IL4 antibody) suggests a plausible role for T-bet expression on the reinforced T_H1 phenotype measured in MIF KO $CD4^+$ T cells. As enhanced IFN- γ secretion and compromised IL-4 responses were measured in MIF KO $CD4^+$ T cells *both in vitro* and *in vivo*, it seems that these cells have an “intrinsic” ability to differentiate into T_H1 cells when cultured in absence of IL-4.

The molecular events modulating $CD4^+$ T cell commitment following their activation during *P.c. adami* infection are unknown and may certainly differ from those conferred by mere *in vitro* stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. It is assumed that the intensity and duration of the primary stimulus through the TCR may also profoundly influence type 1/type 2 differentiations. T_H2 development requires longer periods of TCR engagement and the polarizing effects of IL-4 are induced only if this cytokine is present during the initial events in TCR triggering (42). As significantly lower IL-4 responses were induced in MIF KO mice at day 4 post-infection and as these responses remained relatively low through-out patent infection, we suggest that an unfavourable environment for T_H2 cell differentiation is a major cause for enhanced IFN- γ responses in MIF KO $CD4^+$ T cells from mice at early infection. This assumption remains however speculative, and the role for MIF on the induction and magnitude of B cell-mediated responses during primary and secondary infection requires investigation.

In opposition to improved resolution of *P.c. adami* infection in MIF deficient hosts, intracellular infections with *Toxoplasma gondii* and *Leishmania major*, essentially controlled by T_H1 cells(43-45), are exacerbated in MIF deficient hosts (46, 47). It is tempting to suggest that the contrasting outcomes of MIF deficiency on *P.c. adami* versus *T. gondii* and *L. major* infections rely on the probable involvement for MIF in IFN- γ -independent innate responses that are protective in *Toxoplasmosis* and *Leishmaniasis* but deleterious in malaria. This assumption is sustained by the fact that

purified MIF directly mediates intracellular killing of *L. major* through an IFN- γ -independent but TNF- α -dependent mechanism (48). In addition, glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins from *T. gondii* trigger the release of TNF- α release in macrophages through toll like receptors (TLR)-2 and TLR-4 signalling which is important for protection as TLR-2/TLR-4 double-deficient mice, albeit efficiently producing IL-12 and IFN- γ , are more susceptible to ME49 infection (49). In this context, the lower TLR expression reported in MIF KO macrophages (9), also corroborated in our laboratory, may hamper protective *T. gondii* GPI-dependent TNF- α responses in MIF-deficient mice. In contrast, the Myeloid Differentiation Primary-Response gene 88 (MyD88) and TLRs are important factors in malarial pathology (50). Indeed, MyD88 deficient mice display decreased TNF- α and IFN- γ responses and minor morbidity when infected with non-lethal *P.c. adami* DK parasites and interestingly, this deficiency does not affect their capacity to rapidly resolve secondary infections (51).

Taken together, our data suggests that MIF is not only a contributor to inflammation, but also attenuates the development of T_H1 responses in malaria by enhancing IL-4 responses most probably by basophils and mast. The role for MIF on the down-regulation of T-bet expression in resting CD4⁺ T cells and its eventual impact on their abilities to secrete IFN- γ and to respond to IL-12 stimulation remains to be investigated.

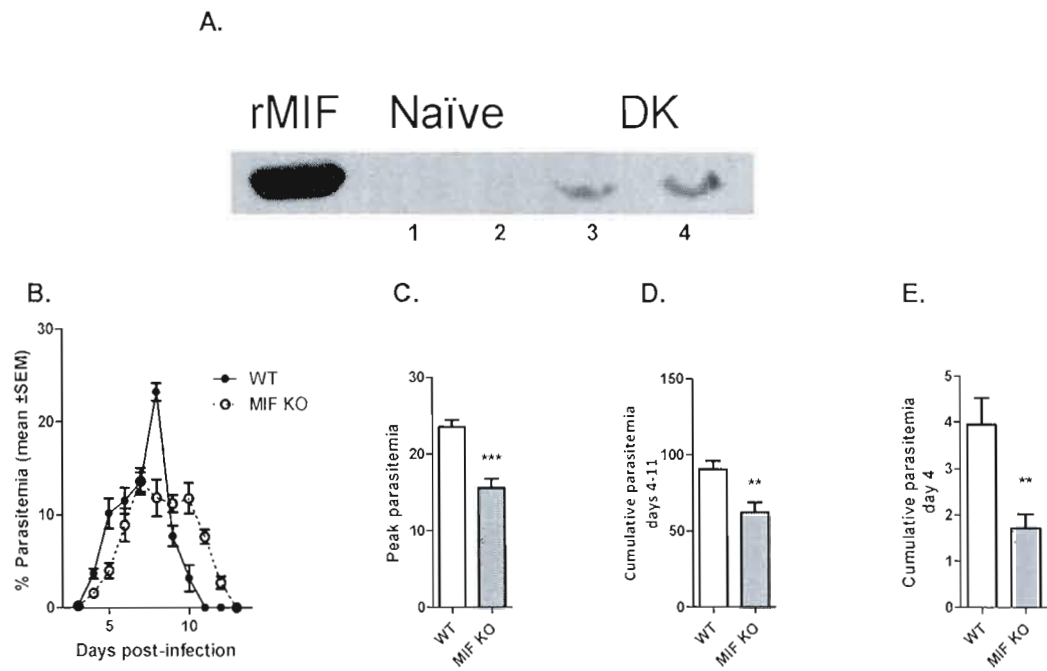


Figure 6. Systemic release of MIF during *P. c. adami* DK infection was demonstrated by Western Blot analysis of similar amounts of undiluted sera from naïve (1,2) and infected (3,4) mice (peak infection). Kinetics of *P. c. adami* DK infection, peak and cumulative parasitemia in MIF KO mice (B, C, D, E). Data represent the compilation of two independent experiments ($n=8$ mice per group). Values were compared with wild type (WT) mice using a non parametric Student T Test. *** $P<0.001$; ** $P<0.01$.

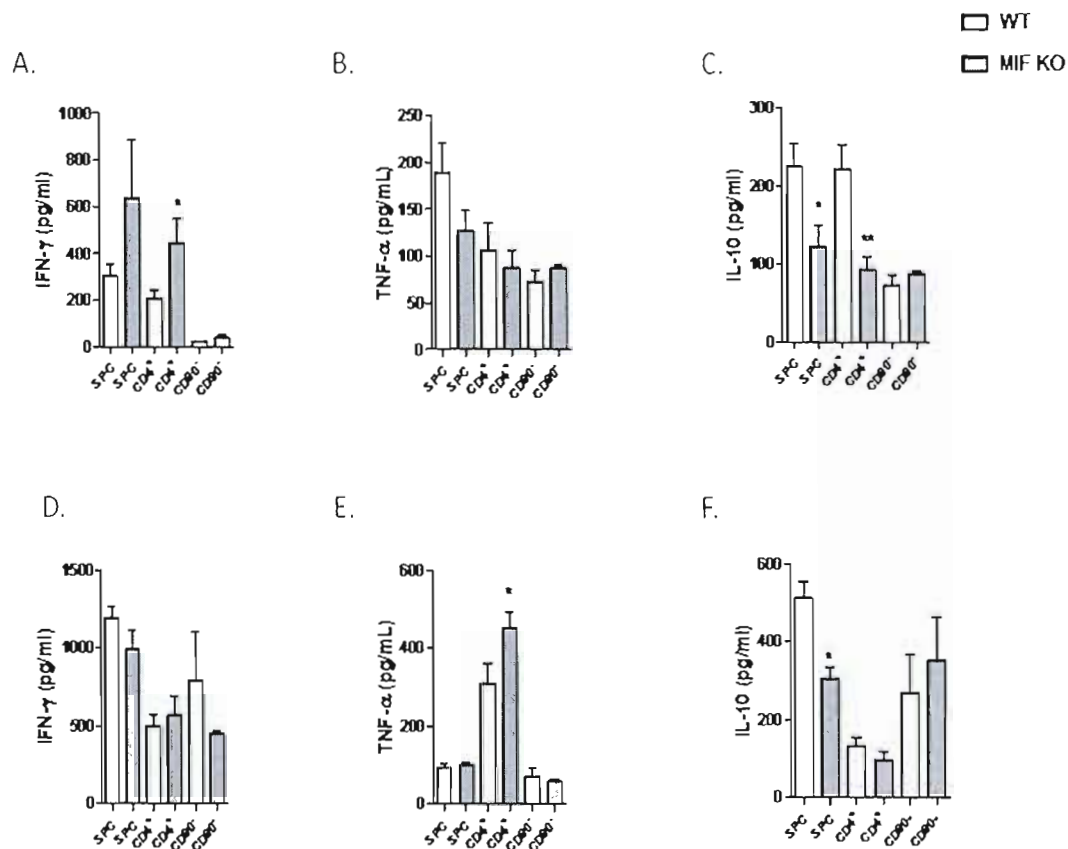


Figure 7. Cytokine responses in total SPC, CD4⁺ T and CD90⁻ splenic cells from wild type (WT) and MIF KO *P.c. adami* infected mice harvested at days 4 (A-C) and day 8 (D-F) post-infection. Concentrations of IFN- γ (A, D), TNF- α (B, E) and IL-10 (C, F) were determined in 48h culture supernatants by ELISA; 8 mice per group were assessed. Values were compared between WT and MIF KO cells for each cell type using a non parametric Student T Test. **P<0.01; *P<0.05.

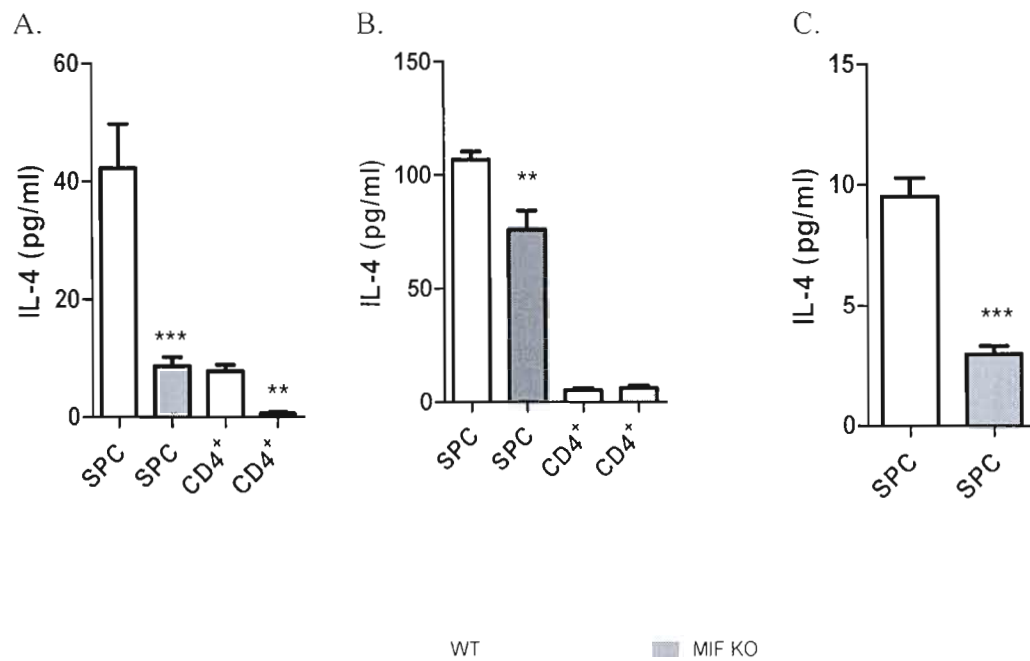


Figure 8. IL-4 responses in total (SPC) and CD4⁺ T splenic cells from wild type (WT) and MIF KO *P.c. adami* infected mice harvested at days 4 (A), day 8 (B) and day 12 of infection (C). Concentrations of IL-4 were determined in 48h culture supernatants by ELISA; 8 mice per group were assessed at day 4 of infection, whereas 4 mice per group were considered for day 8 and 12 of infection. Values were compared between WT and MIF KO cells for each cell type using a non-parametric Student T Test. ***P<0.001; **P<0.01.

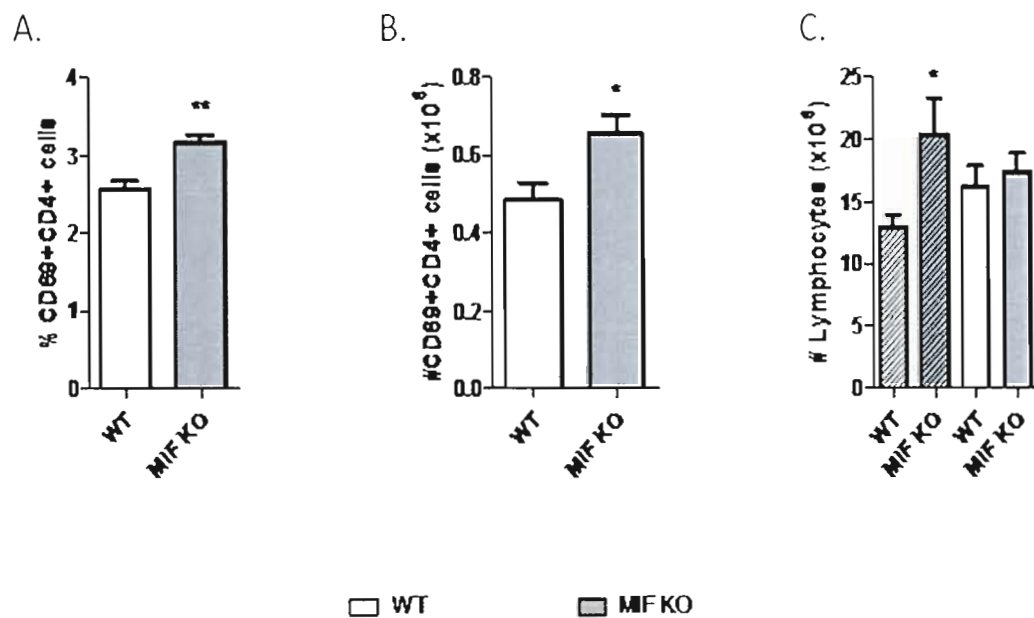


Figure 9. Percentages and absolute numbers of total and activated CD4⁺ T cells in *P.c.adami* infected mice (day 4 post-infection). Spleen cell suspensions of wild type (WT) and MIF KO mice were prepared and stained with anti-CD69 and anti-CD4 monoclonal antibodies for analysis by flow cytometry. The percentages of CD4⁺CD69⁺ cells (A) and their absolute numbers (B), as well as the absolute numbers of splenic CD4⁺ T cells (C) were determined in the 8-10 mice per group (naive mice are represented with dashed bars in C). Values were compared between WT and MIF KO cells using a non-parametric Student T Test. **P<0.01, *P<0.05.

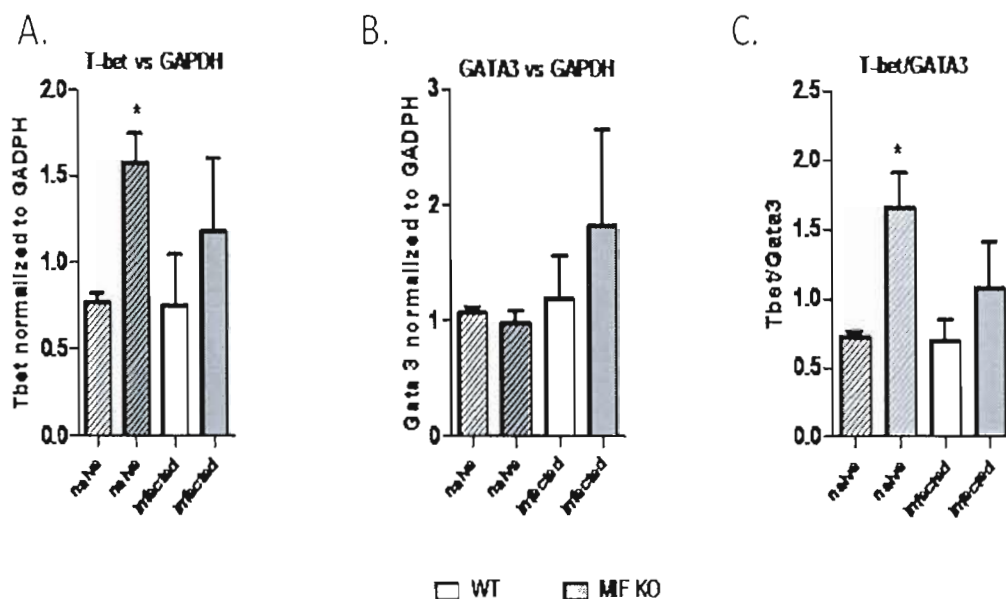


Figure 10. Determination of Tbet and GATA3 gene expression levels in CD4 + T cells purified from naive and *P.c. adami* DK-infected mice at day 4 post-infection infection by RT-PCR. Relative expression levels of Tbet (A) and GATA3 (B) were normalized to GAPDH by densitometry, and Tbet/GATA ratios were estimated (C). Naive mice are represented with dashed bars and data from 4 mice per group is represented. Values were compared between WT and MIF KO cells using a non parametric Student T Test. *P<0.05.

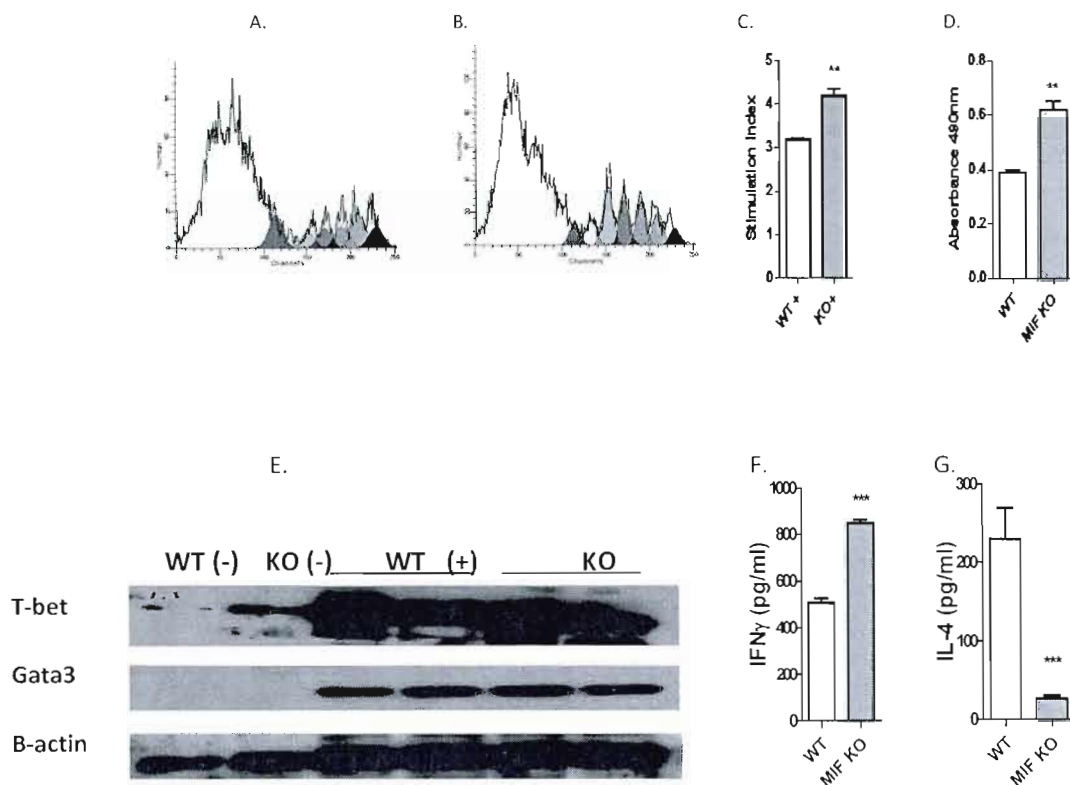


Figure 11. Proliferation and cytokine responses in purified CD4⁺ T cells from naive wild type (WT) and MIF KO mice stimulated *in vitro* with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. In four independent experiments, CD4⁺ T cells were labelled with CFSE (A,B) or remained unlabelled prior to stimulation for 48 h. Mitotic profiles from WT (A) and MIF KO (B) CD4⁺ T cells were analysed by flow cytometry (MODFIT program) and the stimulation indexes were accordingly determined (C). Alternatively, in experiments using unlabelled CD4⁺ T cells, the cellular metabolic activity was determined with the Cell Titer 96 aqueous non-radioactive cell proliferation assay (Promega, USA) and represented as the absorbance at 490nm (D). T-bet, Gata3 and B-actin expression were assessed by Western Blot 48h post-stimulation (E) and IFN-γ (F) and IL-4 (G) content in 48h culture supernatants were assessed by ELISA. Values were compared between WT and MIF KO cells using a non-parametric Student T Test. ***P<0.001; **P<0.01.

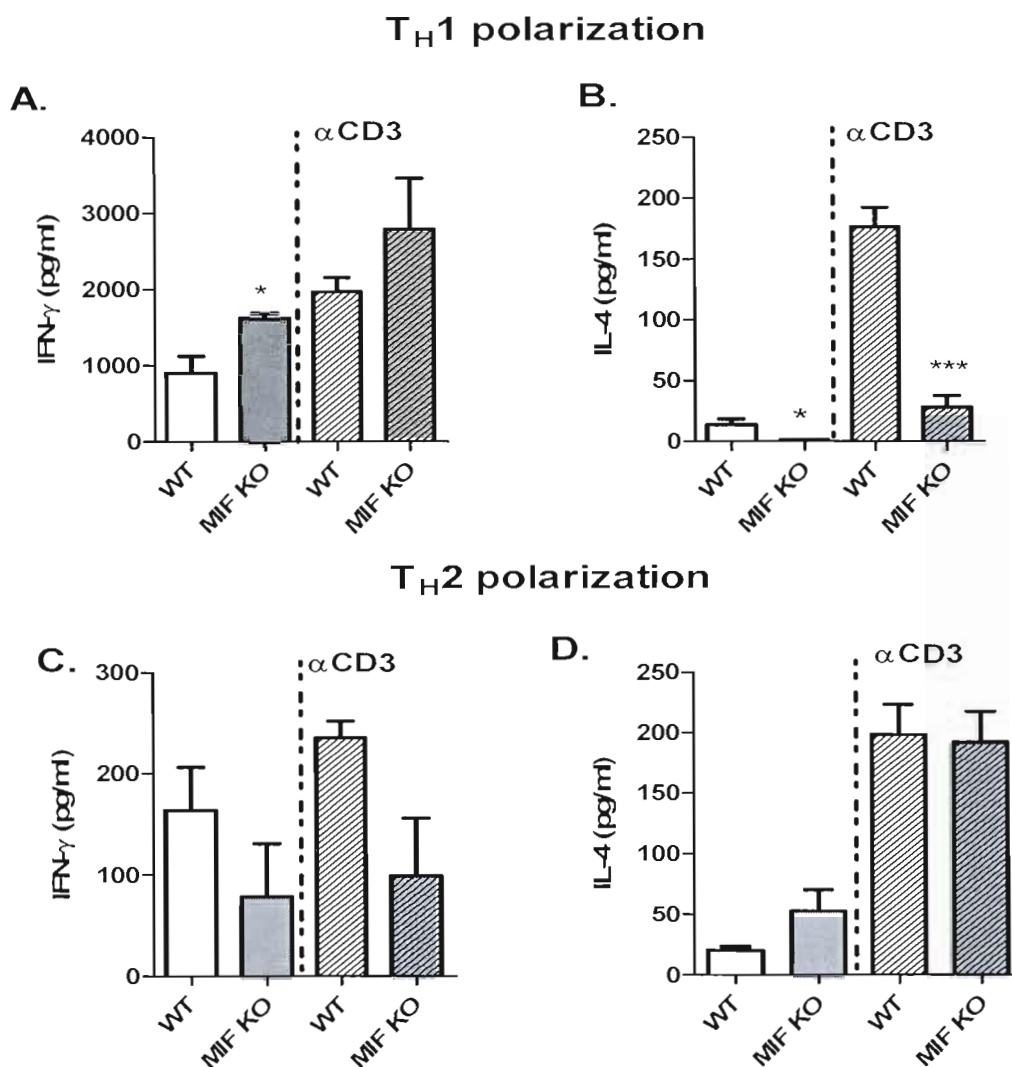


Figure 12. Cytokine responses in purified CD4⁺ T cells from naive wild type (WT) and MIF KO mice stimulated under T_H1 (A, B) or T_H2 (C, D) polarizing conditions. In two independent experiments, purified CD4⁺ T cells were stimulated for 3 days with plate bound anti-CD3 antibody and soluble anti-CD28 antibody in the presence of IL-12p70 (with or without anti-IL-4 antibody) and IL-2 for T_H1 commitment, or in the presence of IL-4 (with or without anti-IFN-γ antibody) and IL-2 for T_H2 commitment and allowed to rest for 48 h prior to final stimulation for 24h with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies and recovery of supernatants for IL-4 (A, C) and IFN-γ (B, D) assessment by ELISA. Values were compared between WT and MIF KO cells using a non-parametric Student T Test. *P<0.05.

3.6 References

1. Bacher M, M. C., Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D, Donnelly T, Bucala R. 1996. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:7849-7854.
2. Lolis E, B. R. 2003. Macrophage migration inhibitory factor. *Expert Opin Ther Targets*. 7:153-164.
3. Nathan CF, P. T., Wiebe ME, Stanley ER, Platzer E, Remold HG, Welte K, Rubin BY, Murray HW. 1984. Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon-gamma. *J Exp Med*. 160:600-605.
4. JR., D. 1966. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 56:72-77.
5. Bloom BR, B. B. 1966. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*. 153:80-82.
6. Bach JP, R. B., Meyer B, Dodel R, Bacher M. 2008. Role of MIF in inflammation and tumorigenesis. *Oncology*. 75.
7. Flaster H, B. J., Calandra T, Bucala R. 2007. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Mol Endocrinol*. 21:1267-1280.
8. Onodera S, S. K., Matsuno T, Kaneda K, Takagi M, Nishihira J. 1997. Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. *Immunology*. 92:131-137.
9. Roger, T., J. David, M.P. Glauser, and T. Calandra. 2001. MIF regulates

- innate immune responses through modulation of toll-like receptor 4. *Nature*. 414:920-924.
10. Cooke G, A. M., Donnelly SC. 2009. Macrophage migration inhibitory factor (MIF), enzymatic activity and the inflammatory response. *Biofactors*. 35.
 11. Abe R, P. T., Sailors J, Bucala R, Metz CN. 2001. Regulation of CTL response by macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol*. 166:747-753.
 12. Kobayashi M, N. Y., Kamachi A, Tanino Y, Betsuyaku T, Yamaguchi E, Nishihira J, Nishimura M. 2006. Role of macrophage migration inhibitory factor in ovalbumin-induced airway inflammation in rats. *Eur Respir J*. 27:726-734.
 13. Mizue Y, G. S., Leng L, McDonald C, Kong P, Baugh J, Lane SJ, Craft J, Nishihira J, Donnelly SC, Zhu Z, Bucala R. 2005. Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:14410-14415.
 14. Stavitsky AB, M. C., Liu S, Xianli J, Bucala R. 2003. Blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in *Schistosoma japonicum*-infected mice results in an increased adult worm burden and reduced fecundity. *Parasite Immunol*. 25:369-374.
 15. Awandare GA, O. Y., Ouma C, Were T, Otieno R, Keller CC, Davenport GC, Hittner JB, Vulule J, Ferrell R, Ong'echa JM, Perkins DJ. 2007. Role of monocyte-acquired hemozoin in suppression of macrophage migration inhibitory factor in children with severe malarial anemia. *Infect Immun*. 75:201-210.
 16. Clark IA, A. L., Budd AC, Cowden WB. 2008. Understanding the role of inflammatory cytokines in malaria and related diseases. *Travel Med Infect Dis*. 6:67-81.
 17. Clark IA, B. A., Alleva LM, Cowden WB. 2006. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar J*. 5:85.

18. McDevitt MA, X. J., Shanmugasundaram G, Griffith J, Liu A, McDonald C, Thuma P, Gordeuk VR, Metz CN, Mitchell R, Keefer J, David J, Leng L, Bucala R. 2006. A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. *J Exp Med*. 203:1185-1196.
19. Miller KL, S. P., Kullgren B, Mahlmann LJ. 1989. Tumor necrosis factor alpha and the anemia associated with murine malaria. *Infect Immun*. 57:1542-1546.
20. Martiney JA, S. B., Metz CN, Espinoza M, Ferrer AS, Calandra T, Broxmeyer HE, Bucala R. 2000. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of Plasmodium chabaudi-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infect Immun*. 68:2259-2267.
21. Jain V, M. S., Nagpal AC, Dash AP, Stiles JK, Udhayakumar V, Singh N, Lucchi NW. 2009. Macrophage migration inhibitory factor is associated with mortality in cerebral malaria patients in India. *BMC Res Notes*. 2:36.
22. Chaisavaneeyakorn S, M. J., Othoro C, Otieno J, Chaiyaroj SC, Shi YP, Nahlen BL, Lal AA, Udhayakumar V. 2002. Immunity to placental malaria. IV. Placental malaria is associated with up-regulation of macrophage migration inhibitory factor in intervillous blood. *J Infect Dis*. 186:1371-1375.
23. Awandare GA, H. J., Kremsner PG, Ochiel DO, Keller CC, Weinberg JB, Clark IA, Perkins DJ. 2006. Decreased circulating macrophage migration inhibitory factor (MIF) protein and blood mononuclear cell MIF transcripts in children with Plasmodium falciparum malaria. *Clin Immunol*. 119:219-225.
24. Awandare GA, K. P., Hittner JB, Keller CC, Clark IA, Weinberg JB, Perkins DJ. 2007. Higher production of peripheral blood macrophage migration inhibitory factor in healthy children with a history of mild malaria relative to children with a history of severe malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 76:1033-1036.

25. Awandare GA, M. J., Were T, Ouma C, Davenport GC, Ong'echa JM, Wang W, Leng L, Ferrell RE, Bucala R, Perkins DJ. 2009. MIF (macrophage migration inhibitory factor) promoter polymorphisms and susceptibility to severe malarial anemia. *J Infect Dis.* 200:629-637.
26. Yap GS, S. M. 1994. Blood transfusion alters the course and outcome of *Plasmodium chabaudi* AS infection in mice. *Infect Immun.* 62:3761-3765.
27. Falanga PB, P. d. S. L. 1989. Acute virulent infection with *Plasmodium chabaudi* does not impair the generation of a protective immune response. *Parasite Immunol.* 11:603-613.
28. Taylor-Robinson AW, P. R. 1993. Protective CD4⁺ T-cell lines raised against *Plasmodium chabaudi* show characteristics of either Th1 or Th2 cells. *Parasit Immunol.* 15:301-310.
29. AW., T.-R. 2010. Regulation of immunity to *Plasmodium*: Implications from mouse models for blood stage malaria vaccine design. *Exp Parasitol.*
30. De Souza JB, W. K., Otani T, Playfair JH. 1997. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. *Infect Immun.* 65:1593-1598.
31. Clark IA, H. N., Butcher GA, Cowden WB. 1987. Inhibition of murine malaria (*Plasmodium chabaudi*) in vivo by recombinant interferon-gamma or tumor necrosis factor, and its enhancement by butylated hydroxyanisole. *J Immunol.* 139:3493-3496.
32. Scorza T, G. K., Cambos M, Santamaria C, Tshikudi Malu D, Spithill TW. 2008. Vaccination with a *Plasmodium chabaudi* adami multivalent DNA vaccine cross-protects A/J mice against challenge with P. c. adami DK and virulent *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS parasites. *Int J Parasitol.* 38:819-827.
33. AW., T.-R. 1995. Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. *Parasitol Today.* 11:334-342.

34. Van der Heyde HC, P. B., Batcheler J, Cigel F, Weidanz WP. The time course of selected malarial infections in cytokine-deficient mice. *Exp Parasitol*. 85:206-213.
35. Li C, S. E., Langhorne J. Rodent malarias: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Med Microbiol Immunol*. 189:115-126.
36. Clark IA, H. N. 1983. Evidence for reactive oxygen intermediates causing hemolysis and parasite death in malaria. *Infect Immun*. 39:1-6.
37. Stevenson MM, T. M. 1993. Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection in resistant and susceptible mice. *Clin Exp Immunol*. 92:77-83.
38. Helmbly H, K. M., Troye-Blomberg M. 1998. Expansion of IL-3-responsive IL-4-producing non-B non-T cells correlates with anemia and IL-3 production in mice infected with blood-stage Plasmodium chabaudi malaria. *Eur J Immunol* 28:2559-2570.
39. Wynn, T. A. 2009. Basophils trump dendritic cells as APCs for TH2 responses. *Nat Immunol* 10:679-681.
40. Namazi, M. J., and R. S. Phillips. 2010. Immune responses of NIH mice infected with avirulent and virulent strains of Plasmodium chabaudi adami single and mixed infections. *Korean J Parasitol* 48:23-33.
41. Mullen AC, H. F., Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, Yang SY, Reiner SL. 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292:1907-1910.
42. Iezzi, G., E. Scotet, D. Scheidegger, and A. Lanzavecchia. 1999. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* 29:4092-4101.
43. Neyer LE, G. G., Fort M, Remington JS, Rennick D, Hunter CA. 1997. Role

- of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 65:1675-1682.
44. Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, S. Hayashi, E. Y. Denkers, S. Hieny, P. Caspar, G. Trinchieri, and A. Sher. 1993. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 153:2533-2543.
 45. Araujo FG, W. D., Grumet FC, Remington JS. 1976. Strain-dependent differences in murine susceptibility to toxoplasma. *Infect Immun* 13:1528-1530.
 46. Satoskar AR, B. M., Rodriguez Sosa M, Lin G, David JR. 2001. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. *Infect Immun*. 69:906-911.
 47. Terrazas CA, J. I., Terrazas LI, Saavedra R, Calleja EA, Rodriguez-Sosa M. 2010. *Toxoplasma gondii*: Impaired maturation and pro-inflammatory response of dendritic cells in MIF-deficient mice favors susceptibility to infection. *Exp Parasitol*. 21.
 48. Jüttner S, B. J., Metz CN, Röllinghoff M, Bucala R, Gessner A. 1998. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. *J Immunol* 161:2383-2390.
 49. Debierre-Grockiego F, C. M., Azzouz N, Schmidt J, Bieker U, Resende MG, Mansur DS, Weingart R, Schmidt RR, Golenbock DT, Gazzinelli RT, Schwarz RT. 2007. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 179:1129-1137.
 50. Ropert C, F. B., Gazzinelli R. 2008. Role of TLRs/MyD88 in host resistance and pathogenesis during protozoan infection: lessons from malaria. *Semin Immunopathol*. 30:41-51.

51. Franklin BS, R. S., Antonelli LR, Oliveira RV, Goncalves AM, Sales-Junior PA, Valente EP, Alvarez-Leite JI, Ropert C, Golenbock DT, Gazzinelli RT. 2007. MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. *Microbes Infect.* 9:881-890.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

4.1 Effet de l'absence de MIF sur la concentration d'hémoglobine pendant l'infection létale et non létale avec *P. c. adami*.

Plusieurs cytokines pro-inflammatoires ont la capacité d'interférer avec l'hématopoïèse et une récente étude a montré que le MIF, en inhibant les précurseurs érythroïdes, exacerbe l'anémie durant l'infection avec la souche létale *P.c. adami* AS [10]. Néanmoins, aucune recherche n'a été faite sur l'influence du MIF dans l'anémie induite pendant une infection non létale. En utilisant des souris déficientes en MIF (MIF/KO), nous avons étudié le rôle du MIF sur l'anémie induite durant l'infection par *P. c. adami* (DK) qui se caractérise par une parasitémie modérée ayant un pic au jour 8 post-infection et qui est résolue au jour 15 post-infection [109]. Nous avons aussi étudié l'effet de la déficience en MIF sur l'infection avec *P. c. adami* (DS) une souche qui donne lieu à une infection létale chez les souris BALB/c.

Étant donné qu'une étude préliminaire dans notre laboratoire a montré que lors d'une infection avec *P. c. adami* (DK) ou *P. c. adami* (DS), la sécrétion de MIF allait de pair avec la virulence de l'infection (c'est à dire plus accentuée durant l'infection par la souche létale DS) et comme l'anémie est généralement corrélée avec une baisse de la concentration d'hémoglobine [72, 110], nous avons évalué les niveaux d'hémoglobine chez des souris WT et MIF/KO aux jours 4 et 8 post-infection. Nos résultats démontrent que, lors de l'infection non létale par la souche DK, une diminution comparable de l'hémoglobine sanguine est mesurée chez les souris WT et

MIF/KO autant au début (Fig. 8A) qu'au pic d'infection (Fig. 8B). Cependant lors de l'infection avec la souche virulente DS, les souris déficientes en MIF avaient une concentration d'hémoglobine significativement plus faible que les souris WT au pic d'infection (Fig. 9).

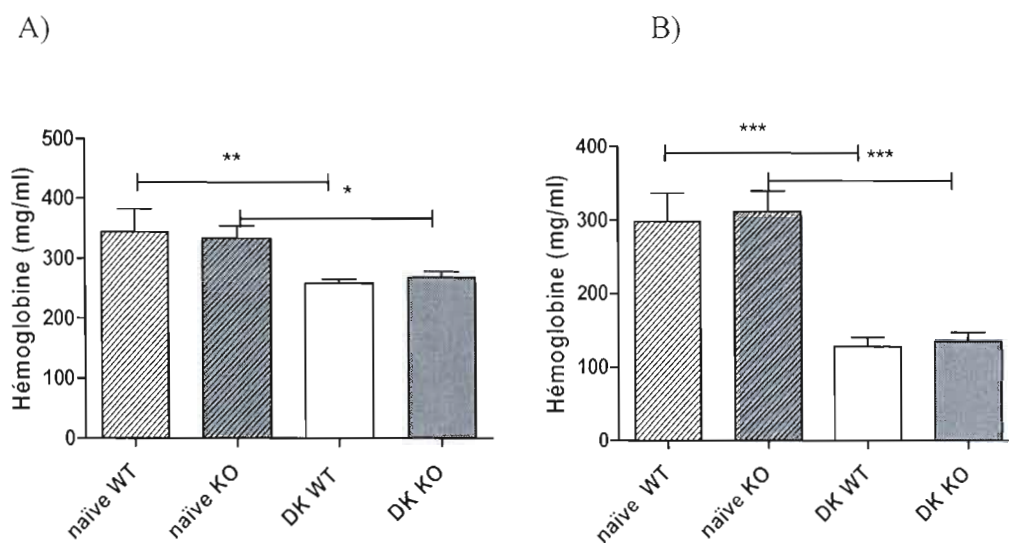


Figure 13: **L'absence de MIF n'altère pas le niveau d'hémoglobine durant l'infection par *P. c. adami* (DK).** Le sang de souris BALB/c WT et MIF/KO non-infectées et infectées avec *P. c. adami* (DK) a été traité avec le réactif de Drabkin pour le dosage d'hémoglobine. Ce dernier a été réalisé 4 jours (A) et 8 jours post-infection (B) par la mesure de l'absorbance. Les résultats représentent la moyenne \pm S.E.M de cinq échantillons de souris naïves et douze échantillons de souris infectées. Une ANOVA couplée à un test Tukey a été utilisé pour l'analyse des données par le logiciel Prism entre les échantillons WT et MIF/KO. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

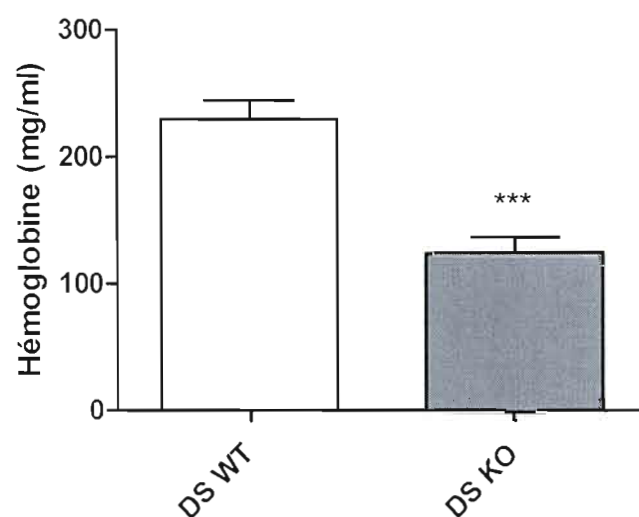


Figure 14: **La déficience en MIF amène à une baisse de la concentration d'hémoglobine plus accentuée durant l'infection par *P. c. adami* (DS).** Le sang des souris BALB/c WT et MIF/KO infectées avec *P. c. adami* (DS) a été traité avec le réactif de Drabkin permettant de doser l'hémoglobine, qui a été effectué au pic d'infection par la lecture de l'absorbance. Les résultats représentent la moyenne \pm S.E.M de six échantillons provenant des souris WT DS et trois des souris KO DS. Un T test non paramétrique a été utilisé pour l'analyse des données sur le logiciel Prism. *** $P < 0.001$.

4.2 Effet de l'absence de MIF sur la réticulocytose.

Quoiqu'au niveau du dosage d'hémoglobine, aucune différence n'a été mesurée entre les souris WT et MIF/KO suite à l'infection non létale par *P. c. adami* (DK), nous avons remarqué que le niveau des réticulocytes, les précurseurs d'érythrocytes engendrés pour atténuer l'anémie [111], était moins élevé chez les souris MIF/KO autant pour le début que pour le pic d'infection (Fig. 10A et 10B), ce qui suggère une anémie moins forte lors de l'absence de MIF, étant donné que la réticulocytose est un paramètre en corrélation avec les niveaux d'anémie. Par contre, lors de l'infection létale avec *P. c. adami* (DS) le pourcentage de réticulocytes était significativement supérieur chez les souris MIF/KO (Fig. 11) et en corrélation avec les niveaux plus faibles d'hémoglobine mesurés chez ces souris, qui dénotent une anémie plus exacerbée. Dans des conditions physiologiques normales, l'érythropoïèse se produit généralement dans la moelle osseuse, néanmoins, dans une situation de grande demande érythropoïétique chez la souris, comme durant l'hémolyse causée par *Plasmodium*, l'érythropoïèse se déplace temporairement dans un site extramédullaire telle que la rate, qui a un microenvironnement convenant mieux à l'expansion des précurseurs érythroïdes [111]. Suite au marquage des splénocytes des souris WT et MIF/KO avec des anticorps anti-CD71 et anti-TER119 permettant de distinguer les précurseurs immatures de la lignée érythroïde, nous avons déterminé un pourcentage plus élevé de précurseurs érythroïdes chez les souris WT, confirmant ainsi la présence d'une anémie plus importante chez ces dernières (et donc moins d'anémie chez les souris déficientes en MIF) lors de l'infection avec *P. c. adami* (DK).

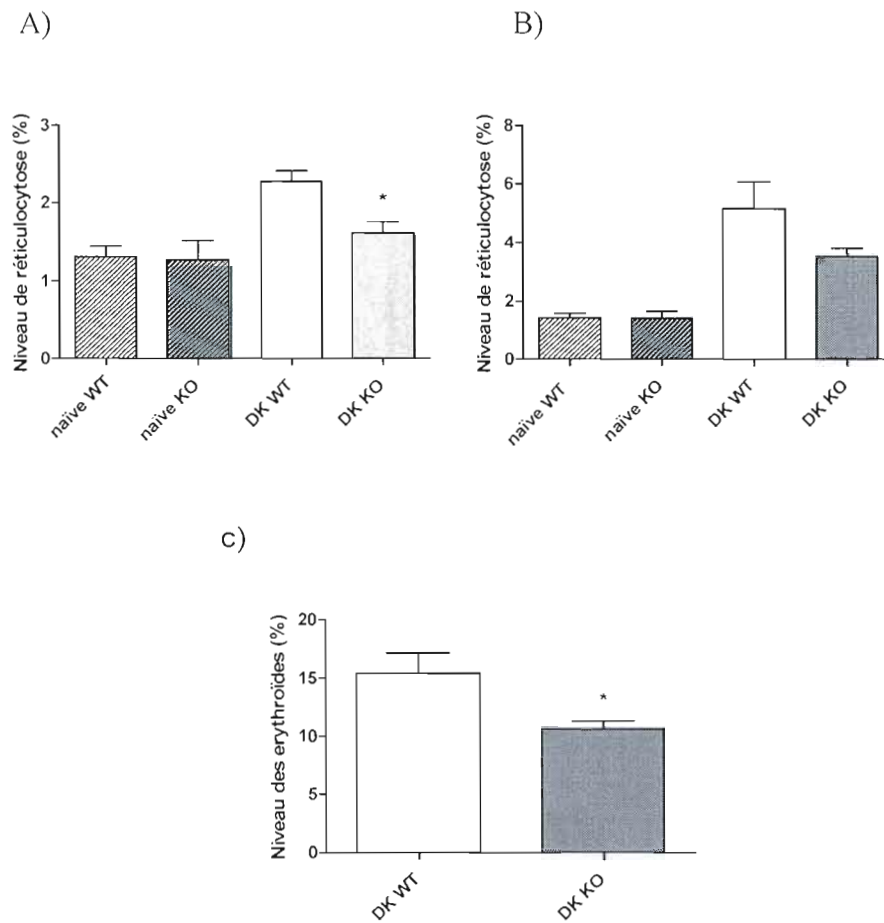


Figure 15: **L'absence de MIF diminue l'anémie durant l'infection non létale par *P. c. adami* (DK).** Le sang de souris BALB/c WT et MIF/KO non-infectées et infectées avec *P. c. adami* (DK) a été fixé dans une solution de glutaraldéhyde 0.025% et la quantification des réticulocytes a été effectuée par marquage extracellulaire avec un anticorps anti-CD71. Les splénocytes de souris BALB/c WT et MIF/KO ont été marqués avec les anticorps anti-CD71 et anti-Ter119 permettant d'identifier les précurseurs érythroïdes immatures. La détection du marquage a été faite par cytométrie de flux 4 jours (A, C) et 8 jours (B) post infection. Les résultats représentent la moyenne \pm S.E.M de $n = 5$ pour les souris naïves et $n = 12$ pour les souris infectées. Une ANOVA couplée à un test Tukey et Un T test non paramétrique ont été utilisés pour l'analyse des données entre les échantillons WT et MIF/KO par le logiciel Prism. * $P < 0.05$.

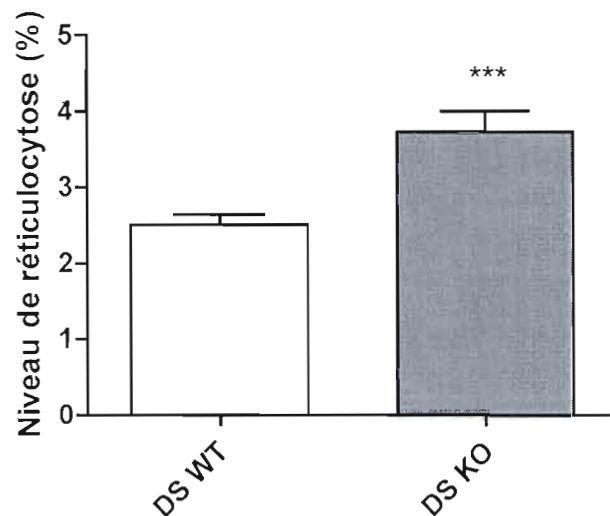


Figure 16: **En absence de MIF, une réticulocytose accrue est mesurée en réponse à l'infection par *P. c. adami* (DS).** Le sang de souris BALB/c WT et MIF/KO infectées avec *P. c. adami* (DS) a été fixé dans une solution de glutaraldéhyde 0.025% et la quantification de réticulocyte a été effectuée par marquage extracellulaire à l'aide d'un anticorps anti-CD71. La détection du marquage a été faite par cytométrie de flux au pic d'infection. Les résultats représentent la moyenne \pm S.E.M de $n = 5$ pour les souris naïves et $n = 12$ pour les souris infectées. Un test T non paramétrique a été utilisé pour l'analyse des données sur le logiciel Prism.*** $P < 0.001$.

4.3 Les souris MIF/KO ont une faible expression constitutive des récepteurs TLR2 et TLR4 chez les lymphocytes T et les macrophages.

Le MIF a plusieurs fonctions dont celle d'augmenter l'expression des récepteurs TLR4 chez les macrophages permettant ainsi une meilleure réponse au LPS. En plus, le LPS stimule à son tour l'expression de TLR4 ce qui en retour pourrait favoriser la synthèse et la sécrétion de MIF [3, 112]. Dans ce contexte, il a été démontré que la sécrétion de MIF est stimulée via la voie de signalisation impliquant les récepteurs TLR2 et TLR4 chez des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde [113].

Plusieurs recherches ont rapportés que les TLRs étaient aussi exprimés sur les lymphocytes T et il a été démontré que les ligands des TLRs agissent directement sur les lymphocytes T régulateurs et abolissent leur fonction suppressive [114]. De plus en réponse à une stimulation des TCR, les TLRs présentent une fonction de co-stimulateur et une étude d'Imanishi et al, [95] a montré que la stimulation de TLR2, exprimé sur les lymphocytes T effecteurs Th1, déclenche directement les fonctions effectrices des cellules Th1 en absence de stimulation des TCR [93].

Donc, dans le cadre de notre étude, nous avons observé une activation précoce des lymphocytes T corrélant avec une production accrue de l'IFN- γ au jour 4 post-infections chez des souris MIF/KO. Étant donné que les TLRs sont critiques dans la synthèse des cytokines pro-inflammatoires pendant une infection avec des protozoaires [115, 116] et qu'une atténuation des symptômes est mesurée lors de l'infection par *P. berghei*, chez des souris déficientes en MyD88, protéine impliquée dans la cascade de signalisation de TLR, chez des souris déficientes en TLR2 et chez des souris déficientes TLR9, nous avons évalué l'expression des récepteurs TLR2 et TLR4 chez les macrophages et lymphocytes T en absence de MIF.

Lors de l'infection avec *P. c. adami* (DK), l'expression des récepteurs TLR2 (Fig. 12,

14) et TLR4 (Fig. 13, 15) au début et au pic de parasitémie chez les lymphocytes T et les macrophages était significativement inférieure à celle chez les souris naïves (sans infection). Par contre, aucune différence n'a été observée dans l'expression des récepteurs TLR2 et TLR4 chez les lymphocytes T ou chez les macrophages en provenance des souris WT ou MIF/KO lors de l'infection.

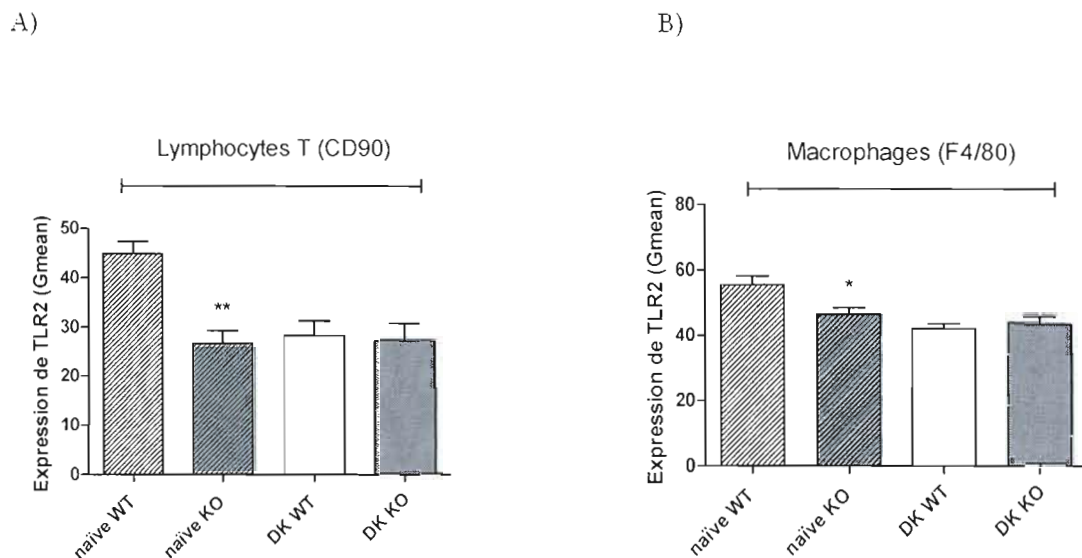


Figure 17: L'absence de MIF amène à une baisse de l'expression basale de TLR2 mais n'altère pas l'effet modulateur de l'infection au début de l'infection. L'expression des récepteurs TLR2 des lymphocytes T marqués avec l'anticorps anti-CD90 (A) et des macrophages marquée avec l'anticorps anti-F4/80 (B) a été déterminée par cytométrie de flux. Ces cellules proviennent des souris sauvages (WT) et déficientes en MIF (MIF/KO) ayant été infectées (DK) ou non infectées (naïve). L'analyse statistique a été effectuée par ANOVA couplée à un test Tukey sur le logiciel Prism entre les échantillons WT et MIF/KO. *P<0.05 et ** P<0.01.

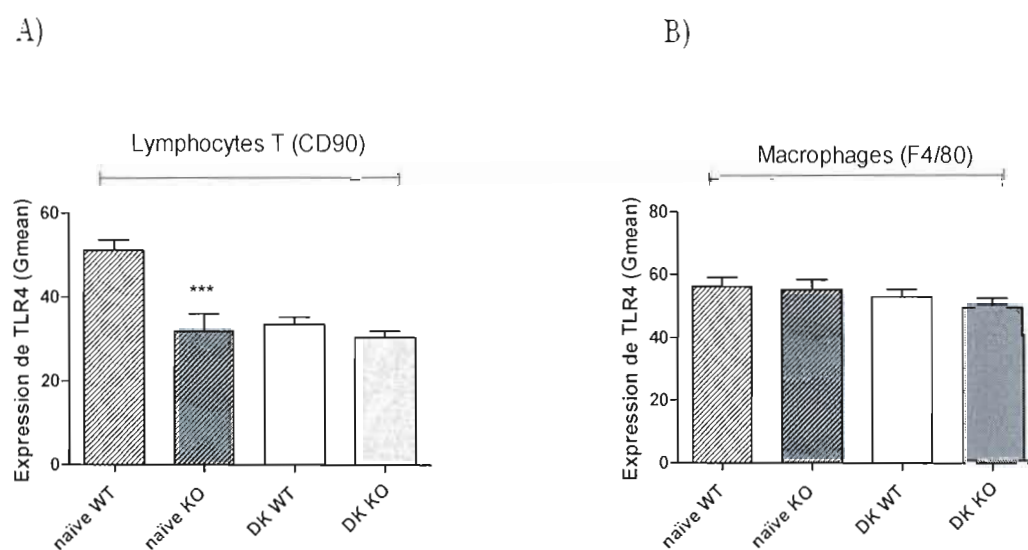


Figure 18: **L'absence de MIF baisse l'expression basale de TLR4 chez les lymphocytes T mais n'altère pas l'effet modulateur de l'infection au début de l'infection.** Les splénocytes des souris WT et MIF/KO non infectées (naïves) et infectés avec *P.C. adami* (DK) ont été marqués avec un anticorps anti-CD90 (A) ou avec un anticorps anti-F4/80 (B) en parallèle avec un marquage avec les anticorps anti-TLR4. Le marquage a été détecté par cytométrie de flux et une ANOVA appariée à un test Tukey a été utilisée pour l'analyse des données par le logiciel Prism entre les échantillons WT et MIF/KO *** < 0.001 .

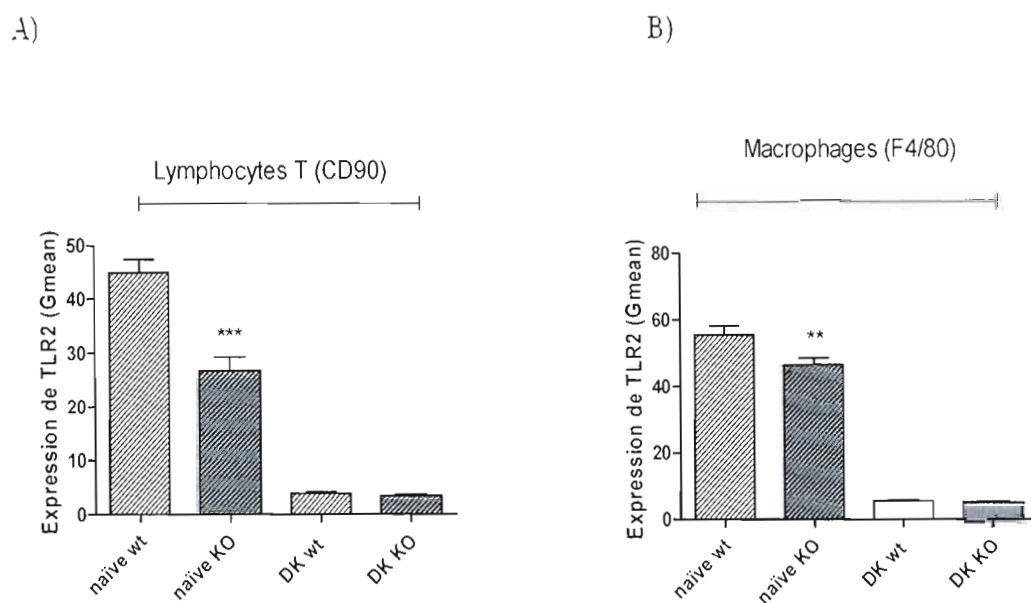


Figure 19: **La déficience de MIF induit une baisse dans l'expression basale de TLR2 mais n'altère pas l'effet modulateur de l'infection au pic de l'infection.** L'expression des récepteurs TLR2 des cellules lymphocytaires T marqués avec l'anticorps anti-CD90 (A) et des macrophages marquée avec l'anticorps anti-F4/80 (B) a été déterminée par cytométrie de flux. Ces cellules provenaient des souris sauvages (WT) et déficientes en MIF (MIF/KO) ayant été infectées (DK) ou non infectées (N). L'analyse statistique a été effectuée par ANOVA couplée à un test Tukey sur le logiciel Prism entre les échantillons WT et MIF/KO. ** $P < 0.01$ et

*** < 0.001 .

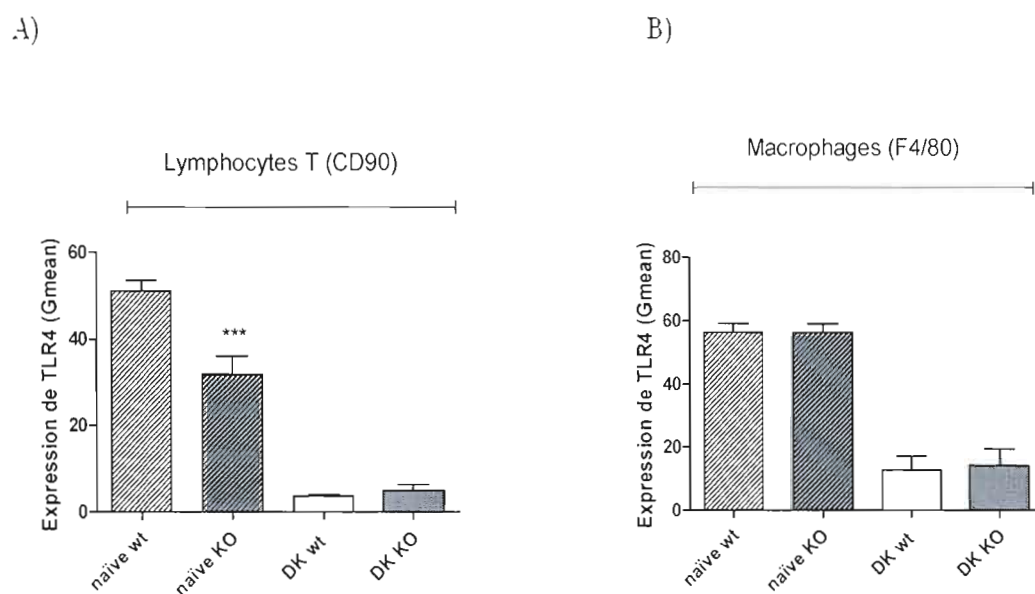


Figure 20: **En absence de MIF, la diminution dans l'expression basale de TLR4 chez les lymphocytes T qui n'altère pas l'effet modulateur de l'infection au pic de l'infection.** Les splénocytes des souris WT et MIF/KO non infectées (naïves) et infectés avec *P.C. adami* (DK) ont été marqués avec les anticorps anti-CD90 (A) ou les anticorps anti-F4/80 (B) en parallèle avec un marquage avec les anticorps anti-TLR4. Le marquage a été détecté par cytométrie de flux et une ANOVA appariée à un test Tukey a été utilisée pour l'analyse des données par le logiciel Prism entre les échantillons WT et MIF/KO. ***< 0.001.

CHAPITRE V

DISCUSSION

Le principal objectif de cette recherche était d'étudier le rôle du MIF dans l'activation des cellules T CD4⁺ lors de l'infection par *P.c. adami*, étant donné que la sécrétion du MIF est stimulée au cours de cette infection. Par conséquent, la cinétique et le pic d'infection, la parasitémie cumulative, la production des cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'anti-inflammatoires ont été analysés.

Durant l'infection avec la souche *P. c. adami* (DK), les souris MIF/KO ont un meilleur contrôle de la parasitémie au début de l'infection, accompagné d'un pic de parasitémie et d'une parasitémie cumulative significativement plus faibles. Pour un contrôle efficace de l'infection avec le parasite *P. c. adami*, l'hôte doit développer une réponse immune impliquant les lymphocytes T de type Th1 au début et au pic d'infection, et des lymphocytes T de type Th2 dans la phase tardive de l'infection [117]. Les cellules Th1 sont les principales cellules productrices d'IFN- γ , une cytokine qui augmente la capacité phagocytaire des macrophages et induit la production des réactifs intermédiaires d'oxygène et du TNF- α par les macrophages en plus de conduire à la différenciation des lymphocytes T en Th1 [117]. Aussi, il a été démontré que l'IFN- γ diminue et crée un délai dans la cinétique d'infection avec *P. c. adami* [118].

En considérant les données suggérant une amélioration de la réponse des cellules T cytotoxiques (CTL) et la production d'IFN- γ dans un modèle de cancer chez des souris déficientes en MIF [119], notre hypothèse était que le MIF pourrait inhiber le développement de la réponse Th1 lors de l'infection par *P.c. adami*, parce

que sa sécrétion est fortement induite par l'hémozoïne [3], ainsi que l'hémine (résultats non publiés de notre laboratoire). Dans ce sens, nous pensons que le contrôle plus efficace de la parasitémie observé en absence de MIF durant l'infection s'explique possiblement par une meilleure activation des macrophages suite à une activation accrue des lymphocytes Th1. Pour corroborer cette hypothèse, nous avons caractérisé la sécrétion de l'IFN- γ et nous avons aussi évalué l'état d'activation des cellules T CD4+. Nos résultats ont montré une plus grande sécrétion de l'IFN- γ et un nombre plus élevé des cellules T CD4+ actives au jour 4 post-infection. En parallèle, le suivi de la production d'IL-10 et d'IL-4 a indiqué une chute importante dans leurs niveaux au début de l'infection ce qui peut en effet expliquer la hausse de la réponse Th1. Dans ce contexte, une production accrue de l'IFN- γ a été observée chez des souris MIF/KO infectées avec *Taenia crassiceps*, un parasite qui induit une forte réponse immune Th2 par la voie de signalisation STAT-6 dont la déficience mène à une forte production d'IFN- γ [120]. Mizue et al, [105] ont démontré que le MIF était impliqué dans l'immunopathogénécité de l'asthme suite à la promotion d'une réponse Th2 induisant la production de l'IL-4, IL-5 ainsi que l'IL-13. Nos résultats suggèrent que le MIF est impliqué dans la modulation de la balance Th1/Th2 car il régule la sécrétion de l'IL-4 par une population de cellules non T et non B, possiblement des basophiles, qui semblent être la source majeure d'IL-4 lors de l'infection par *P. chabaudi* [121]. Ces résultats sont intéressants parce que des récentes recherches ont indiqué que les basophiles, une fois activés, peuvent exprimer des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et agir comme cellules présentatrices d'antigènes solubles en plus de sécréter de l'IL-4 lors d'infection avec des nématodes tel que *Trichuris muris* et *Strongyloides venezuelensis* [121, 122]. Nos résultats suggèrent un rôle possible pour ces cellules dans la malaria en plus d'une modulation évidente de leur activation par le MIF. En effet, en absence de MIF, les cellules non T et non B produisent moins d'IL-4 qui est une cytokine ayant plusieurs fonctions dont celle de réguler la production et les activités de l'IFN- γ et du TNF- α .

en plus de réduire l'induction de la malaria cérébrale et l'anémie dans le modèle murin [123, 124]. Cette faible sécrétion de l'IL-4 favoriserait la production de l'IFN- γ au début de l'infection chez les souris MIF/KO.

Il est connu que la production du MIF par les macrophages est induite par l'IFN- γ et le TNF- α [112], et que la stimulation des macrophages avec du MIF recombinant favorise la sécrétion de TNF- α , ce qui suggère une boucle d'amplification de la production de MIF et de la réponse inflammatoire [112, 125]. L'absence de MIF pourrait ainsi expliquer la tendance à une faible sécrétion de TNF- α mesurée chez les splénocytes des souris MIF/KO lors de l'infection. D'autre par, une étude d'Othoro et al, [124] a montré que durant l'infection par *P. falciparum* chez l'Homme, il y a une corrélation entre la production de TNF- α , la sécrétion de l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) et de l'IL-12, et la sévérité de l'infection [124, 126, 107]. Plus précisément, cette étude montre qu'un faible ratio IL-10/TNF- α est associé à la sévérité de l'anémie tandis qu'un ratio IL-10/TNF- α élevé est associé à des symptômes plus atténués chez des enfants vivants dans une région où la maladie est holoendémique [124]. Dans ce contexte, cette recherche suggère une corrélation entre la sévérité de l'inflammation et la sécrétion de l'IL-10. Étant donné qu'un meilleur contrôle de l'infection, qui mène à une inflammation modérée en parallèle avec une sécrétion réduite de TNF- α , a été détecté chez les souris MIF/KO, le niveau d'IL-10 mesuré chez ces souris au début de l'infection pourrait concorder avec le bas niveau de TNF- α détecté au début de l'infection avec *P. c. adami* (DK). D'autre part, l'IL-10 peut directement réguler la réponse Th1 et Th2 en limitant l'activation et la différenciation des lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques [126], et une diminution dans sa sécrétion pourrait aussi expliquer l'activation significativement plus élevée des lymphocytes T CD4+ mesurée au début de l'infection avec *P. c. adami* (DK).

Les lymphocytes T CD4+ se différencient en trois sous-groupes distincts de

cellules effectrices: les cellules Th1 qui expriment le facteur de transcription T-bet et produisent de l'IFN- γ , les cellules Th2 exprimant le facteur de transcription GATA3 et qui produisent l'IL-4, l'IL-5 ainsi que l'IL-13 et les cellules Th17 qui expriment le facteur de transcription ROR γ t et sont impliquées dans la production de l'IL-17A ainsi que l'IL-17F [128]. Dans la mesure où le MIF semble réguler la réponse Th1 et Th2 par l'entremise de la modulation de la sécrétion de l'IFN- γ et de l'IL-4 au début de l'infection avec *P. c. adami* (DK), nous avons étudié l'impact de l'absence du MIF sur l'expression des facteurs de transcription considérés comme étant les plus importants dans la différenciation Th1/Th2, soient T-bet et GATA3. Étonnamment, une expression élevée de T-bet/HPRT ainsi que le ratio T-bet/GATA3 ont été mesurés chez les lymphocytes T CD4⁺ naïfs provenant des souris MIF/KO. Toutefois, cette différence s'est atténuée durant l'infection. De plus, nous avons obtenu le même profil chez des lymphocytes T stimulés *in vitro*. Ensemble, ces résultats suggèrent que les lymphocytes T CD4⁺ des souris MIF/KO, ont de manière intrinsèque, une meilleure aptitude à se différencier en cellules TH1, surtout, qu'on a récemment découvert que très tôt durant la différenciation Th1, le T-bet interagit physiquement avec GATA3 une fois phosphorylé par la kinase Tec (ITK), empêchant ainsi GATA3 de se fixer au promoteur de l'IL-5 [129]. Dans ce contexte, il est possible que le T-bet affecte les fonctions de GATA3 favorisant ainsi une réponse Th1 plus efficace.

Deux voies de signalisation majeures impliquant les lymphocytes Th1, l'une comportant l'IL-12/STAT4 et l'autre comprenant l'IFN- γ /STAT1/T-bet, ont été révélées au cours de ces dernières années [130]. Il a été montré que le T-bet induit l'expression du récepteur IL-12R β 2, permettant subséquemment aux lymphocytes T de répondre à l'IL-12 et ainsi se différencier en cellules Th1 en suivant la voie de signalisation impliquant les STAT4 [128]. Une expérience préliminaire effectuée dans notre laboratoire montre que les lymphocytes T CD4⁺ répondent mieux à l'IL-

12 ce qui suggère que la surexpression de T-bet observée chez les lymphocytes T CD4⁺ naïfs MIF/KO pourrait jouer un rôle dans cette modulation.

Nos résultats chez des souris MIF/KO contrastent avec ceux de l'étude préliminaire de Benoit Bélanger, qui a utilisé la stratégie de neutralisation avec des anticorps anti-MIF. Des profils opposés au niveau de la sécrétion de TNF- α (hausse versus aucun effet avec le MIF/KO) et IFN- γ (baisse au lieu d'hausse) ont été observés, malgré un impact inhibiteur semblable de la parasitemie. En théorie, l'administration d'anticorps neutralisant permet de bloquer le MIF sécrété mais serait inefficace contre le MIF endogène. Ainsi, des fonctions différentes pour le MIF extracellulaire et intracellulaire sont envisageables et malheureusement, la production d'IL-4 n'a pas été évaluée dans l'étude de Belanger pour envisager une comparaison plus cohérente. Dans un scénario dans lequel la diminution de la production d'IFN- γ est mesurée suite à la neutralisation du MIF, celui-ci pourrait être expliqué si l'anticorps anti-MIF ne modifie pas la production précoce d'IL-4, mais au contraire l'augmente par une hausse dans la production de MIF (retro-activation). En d'autres termes, une hausse du MIF endogène dû à la neutralisation du MIF extracellulaire pourrait activer la sécrétion de l'IL-4 et ainsi inhiber la production d'IFN- γ . D'un autre côté, l'augmentation du TNF- α mesurée chez des souris traitées avec l'anti-MIF pourrait agir en synergie avec l'IFN- γ et augmenter l'expression d'iNOS et la production de NO, un fort inhibiteur des différents stades du cycle infectieux du parasite [59, 60]. De plus, le TNF- α est un fort activateur de la phagocytose, ce qui indirectement augmenterait la phagocytose des parasites et réduirait par conséquence le niveau de parasitémie [12].

Suite à l'infection par *Plasmodium*, plusieurs symptômes liés à la réponse inflammatoire systémique de la maladie telle que la malaria cérébrale et l'anémie sévère ont été imputés à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires résultant des interactions du parasite avec les cellules de l'hôte [131]. Certaines études ont

déterminé qu'il y a suppression de l'érythropoïèse en lien avec des médiateurs inflammatoires [131, 132]. Dans ce contexte, une étude de McDevitt et collaborateurs [10], effectuée sur des lignées de précurseurs érythroïdes *in vitro* ainsi que sur une infection des souris BALB/c MIF/KO avec la souche létale *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS *in vivo*, a montré que le MIF, une cytokine considérée comme pro-inflammatoire, agit comme un inhibiteur potentiel de l'érythropoïèse, en plus d'être impliqué dans l'inhibition de la cytodifférentiation et l'inhibition de la production d'hémoglobine des érythroïdes des lignées cellulaires progénitrices.

Dans notre étude, nous avons évalué l'effet de l'absence du MIF sur le déroulement de l'anémie lors d'une infection non létale avec *P.c. adami* (DK). Les résultats obtenus dévoilent que le niveau d'hémoglobine de souris infectées avec *P.c. adami* (DK) n'est pas modulé par le MIF au début et au pic d'infection contrairement à ce qui a été trouvé par l'équipe de McDevitt et al avec la souche *P. c. chabaudi* (AS) [10]. Cette différence dans les résultats peut s'expliquer par le fait que la souche DK est moins virulente comparativement à la souche AS, induisant de ce fait une anémie moins sévère, qui n'est pas mesurable lors d'un dosage d'hémoglobine. Par ailleurs, il a été montré qu'en dépit du fait que des souris déficientes en RAG (RAG/KO), un gène impliqué dans la différenciation des lymphocytes, infectées avec *P.c. chabaudi* (AS) présentaient moins de globules rouges circulant que des souris WT infectées, elles avaient un niveau d'hémoglobine similaire [133]. De plus, aucune corrélation n'a été observée entre la chute du nombre de globules rouges et le niveau d'hémoglobine des souris infectées avec la souche plus virulent *P. c. chabaudi* (CB), ce qui suggère que la réduction du nombre de globules rouges circulant ne corrèle pas nécessairement avec la baisse du niveau d'hémoglobine dans le sang [133]. Dans ce contexte, l'absence de variation observée entre les souris WT et MIF/KO infectées avec *P.c. adami* (DK) lors du dosage d'hémoglobine vient corroborer les observations décrites précédemment. Comme il a été suggéré par les mêmes auteurs, cette absence

de modulation au niveau de l'hémoglobine s'expliquerait possiblement par des différences au niveau du nombre de réticulocytes mesuré entre les souris WT et les souris MIF/KO infectées. Étant donné que les réticulocytes présentent de l'hémoglobine même à un faible niveau comparativement aux érythrocytes matures [111] et comme durant la malaria, l'infection induit une production de réticulocytes plus élevée à cause de l'anémie [134], il s'en suit que l'hémoglobine des réticulocytes pourrait combler la différence produite par l'absence des érythrocytes matures dans le cas d'une anémie modérée. En dépit de l'absence de modulation apparente au niveau de l'hémoglobine au début et au pic d'infection avec *P. c. adami* (DK) chez les souris WT et MIF/KO, des niveaux de réticulocytes plus élevés dans le sang et l'expression importante des précurseurs érythroïdes ont été mesurés lors de l'infection non létale par *P. c. adami* (DK), ce qui suggère une anémie plus prononcée étant donné que celle-ci est l'inducteur principal de la réticulocytose. Lors d'un stress hypoxique pouvant être causé par de l'anémie aiguë durant la malaria, il y a une augmentation de l'érythropoïétine permettant ainsi la mobilisation des cellules immatures de la moelle osseuse, appelé Colony-Forming Units-Spleen (CFU-S), vers la rate où elles vont se différencier et proliférer. Ces cellules vont créer des colonies très sensibles à l'érythropoïétine exprimant les marqueurs des précurseurs de la lignée érythroïde c-kit, CD71 et TER119 [135, 136]. Cette activité extramédullaire permet une augmentation de l'érythropoïèse qui conduit à une hausse du nombre de réticulocytes dans la circulation sanguine [111].

Comme attendu, en absence de MIF, l'anémie est plus légère et elle va de paire avec une parasitémie plus faible et un meilleur contrôle de l'infection par *P. c. adami* (DK). Cependant lors de l'infection avec la souche virulente *P. c. adami* (DS), les souris MIF/KO ont montré un niveau d'hémoglobine plus faible et un pourcentage de réticulocytes plus élevé et de ce fait, une anémie plus importante. La vitesse de répllication du parasite durant l'infection, la vitesse et la force avec laquelle la réponse

Th1 entre en jeux ainsi que la balance entre une réponse Th1 et Th2 sont des facteurs permettant d'expliquer la différence de virulence entre la souche de *P.c. adami* DK et DS [109]. Durant l'infection avec la souche DS, la densité de réplication du parasite augmente plus rapidement que lors d'une infection avec la souche DK [109]. Étant donné que la sévérité des symptômes est affectée par la dose de parasite injectée à la souris, il a été suggéré que lors d'une infection avec la souche DS, l'hôte infecté n'a pas le temps de mobiliser une bonne réponse immunitaire pouvant circonscrire l'infection avant que le seuil des symptômes cliniques soit atteint [139]. Le contrôle de l'infection avec *P.c. adami* DK et DS au début et au pic d'infection nécessite une bonne réponse Th1 associée à une haute sécrétion d'IFN- γ . Par contre, durant l'infection avec la souche DS, la réponse Th1 n'est pas adéquate pour permettre la survie des souris infectées [109]. Alors, l'incapacité des souris MIF/KO à limiter l'anémie pendant l'infection avec la souche létale *P.c. adami* DS s'expliquerait par le fait que le MIF fait partie des cytokines de la réponse inflammatoire et que sa délétion chez ces souris réduirait l'efficacité de la réponse Th1 qui est déjà défectueuse pendant la malaria avec *P.c. adami* (DS).

Plusieurs études effectuées en grande partie chez des humains infectés par *Plasmodium falciparum* ont montrés que les récepteurs TLR2 et TLR4 sont fortement impliqués dans les réponses immunitaires innée et adaptative [138]. Ces études ont été principalement réalisées pour évaluer la réponse inflammatoire modulée par les cellules dendritiques et les macrophages [138] et selon Thierry Roger et al, le MIF induit l'expression de TLR4 chez les macrophages [3]. Il a été démontré que le TLR2 ainsi que le TLR4 exprimés sur les macrophages reconnaissent la protéine d'ancrage, glycosylphosphatidylinositol (GPI) provenant de *P. falciparum* et induisent par conséquent la sécrétion du TNF- α et du NO [138, 140]. En outre, suite à une stimulation avec son ligand, le lipopolysaccharide (LPS), le TLR4 peut induire la production des cytokines inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-12 *via*

l'utilisation des molécules adaptatrices MyD88 et TIRAP qui sont impliquées dans la principale voie de signalisation des TLRs. Le TLR4 peut aussi stimuler la sécrétion des IFN- α/β en utilisant les molécules adaptatrices TRAM et TRIF [141].

Plusieurs recherches se sont concentrées récemment sur le rôle des TLRs dans la réponse immune adaptative, car on a rapporté l'expression de plusieurs TLRs sur les lymphocytes T, et il a été retrouvé que les récepteurs TLR2 peuvent agir comme molécule co-stimulatrice dans l'activation des lymphocytes T en plus d'aider dans le maintien des lymphocytes T mémoires [91]. Pour étudier si le MIF est impliqué dans la régulation de la réponse Th1 par les récepteurs TLRs, nous avons évalué l'expression des récepteurs TLR2 et TLR4 chez les cellules T et les macrophages des souris MIF/KO durant l'infection par *P. c. adami* (DK). Nos résultats montrent qu'il n'y a aucune modulation dans l'expression des récepteurs TLR4 chez les macrophages en absence de MIF. Par contre, une inhibition dans l'expression constitutive des récepteurs TLR4 et TLR2 exprimés par les lymphocytes T ainsi que les récepteurs TLR2 exprimés sur les macrophages a été détectée en absence de MIF. Etant donné que le MIF est sécrété de manière constitutive chez les souris WT, il pourrait être suffisant pour augmenter l'expression des récepteurs TLR2 et TLR4 chez les lymphocytes T et TLR2 chez les macrophages. Toutefois, la concentration du MIF n'est peut-être pas assez élevée pour permettre l'expression des récepteurs TLR4 chez les macrophages, car les précédentes observations qui indiquent un effet stimulateur du MIF sur le TLR4 ont été faites lorsque les macrophages étaient stimulés au LPS.

Au début de l'infection avec *P. c. adami* (DK), l'expression des récepteurs TLR2 et TLR4 chez les lymphocytes T ainsi que TLR2 chez les macrophages provenant des souris WT diminue significativement, et cette baisse est fortement accentuée au pic d'infection autant chez souris WT que chez les souris MIF/KO.

Une étude de Babu et al, 2006 [142] a suggéré qu'une diminution dans l'expression des récepteurs TLR1, TLR2 et TLR4 chez les lymphocytes T durant une infection par filariose chez l'humain, liée à une baisse dans l'activation des lymphocytes T, permettait au parasite d'échapper à la réponse immune Th1. Dans ce contexte, il est possible que la baisse de l'expression de TLR2 exprimée par les cellules T et les macrophages ainsi que la diminution de l'expression de TLR4 exprimée par les cellules T en réponse à l'infection par *P. c. adami* (DK) soit l'un des moyens qu'a trouvé le parasite pour esquiver la réponse immunitaire de l'hôte, étant donné que les récepteurs TLRs sont impliqués dans l'activation de la réponse inflammatoire nécessaire au contrôle de l'infection par *Plasmodium* [143]. Pour ce faire, une diminution dans l'expression des récepteurs TLRs pourrait avoir des conséquences dans la résolution complète de l'infection avec *P. c. adami* (DK) après le pic d'infection (fig. 6).

En conclusion, cette étude a permis de montrer que le MIF joue un rôle dans la balance de la différenciation Th1/Th2 chez les lymphocytes T CD4⁺ durant l'infection avec *P. c. adami* (DK). Le MIF induit la production précoce de l'IL-4 par des cellules non T et non B ce qui favorise l'installation d'une réponse Th2 précoce durant l'infection. Cette réponse Th2 hâtive module négativement l'implantation de la réponse Th1 ayant ainsi pour conséquence de réduire la capacité de l'hôte à se défendre contre l'infection. En plus, l'augmentation de la production d'IL-4 possiblement par des basophiles pourrait aussi augmenter la sévérité de l'anémie.

Un autre élément important dans notre étude est la surexpression de T-bet chez des lymphocytes T CD4⁺ déficients en MIF et lorsqu'ils sont stimulés, ils sécrètent plus d'IFN- γ ; ces cellules ont en plus une meilleure réponse au traitement avec l'IL-12. Globalement, en absence de MIF, les lymphocytes T CD4⁺ semblent avoir, de manière intrinsèque, une meilleure propension à se différencier en cellules Th1.

OUVERTURE SUR LE PROJET

Cette étude suggère une fonction pour le MIF dans la balance de la différenciation Th1/Th2 chez les lymphocytes T CD4⁺ durant l'infection avec *P. c. adami* (DK). Etant donné que le MIF favorise la production précoce de l'IL-4 par des cellules non T et non B et ainsi, l'installation d'une réponse Th2 précoce durant l'infection, il sera envisageable de bien caractériser les cellules impliquées dans la production de l'IL-4. En effet, les basophiles seraient les cellules candidates à prioriser, car ils sont décrits comme les producteurs de l'IL-4 durant la réponse immunitaire innée dans le cas de certaines infections tel que celle avec *N. brasiliensis*. De plus comme la réponse Th2 hâtive module négativement l'implantation de la réponse Th1 réduisant ainsi la capacité de l'hôte à se défendre contre l'infection, l'implication de l'IL-4 sur la sévérité de l'anémie pendant l'infection avec *P. c. adami* (DK) serait un deuxième élément à évaluer.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Augustijn D. K., R. Kleemann. J. Thompson. T. Kooistra. C. E. Crawford. S. E. Reece. A. Pain et al.** 2006. Functional characterization of the *Plasmodium falciparum* and *P.berghei* homologue of macrophage migration inhibitory factor. *Infect. Immun.* **75** (3): 1116-1128.
- [2] **Oda S. T. Oda. K. Nishi. S. Takabuchi. T. Wakamatsu. T. Tanaka. T. Adachi et al.** 2008. Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-induction factor in a p53-dependent manner. *PLoS ONE*. **3**(5): e2215. doi:10.1371/journal.pone.
- [3] **Calandra T. et T. Roger.** 2003. Macrophage migration inhibitory factor: A regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 791-800.
- [4] **Awandare A. G. P. G. Kremsner. J. B. Hittner. C. C. Keller. I. A. Clark. J. B. Weinberg et D. J. Perkins.** 2007. Short report: Higher production of peripheral blood macrophage migration inhibitory factor in healthy children with a history of mild malaria relative to children with a history of severe malaria. *AM. J. Trop. Med. Hyg.* **76**(6): 1033-1036.
- [5] **Reyes L. J. L. I. Terrazas. B. Espinoza. D. Cruz-Robles. V. Soto. I. Rivera-Montoya. L. Gomez-Garcia et al.** 2006. Macrophage migration inhibition factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* **74**(6): 3170-3179.
- [6] **De Mast Q. F. C. G. J. Sweep. M. McCall. A. Geurts-Moespot. C. Hermesen. T. Calandra et al.** 2008. A decrease of plasma macrophage migration inhibitory factor concentration is associated with lower numbers of circulating lymphocytes in experimental *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasite. Immunol.* **30**: 133-138.
- [7] **Bacher M. C. N. Metz. T. Calandra. K. Mayer. J. Chesney. M. Lohoff. D. Gemsa et al.** 1996. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 7849-7854.

- [8] **Cordery V. D. U. Kishore. S. Kyes. M. J. Shafi. K. R. Watkins. T. N. Williams. K. Marsh et al.** 2007. Characterisation of a *Plasmodium falciparum* macrophage migration inhibitory factor homologue. *Am. J. Infect. Dis.* **195**: 905-912.
- [9] **Awandare A. G. J. B. Hittner. P. G. Kremsner. D. O. Ochiel. C. C. Keller. J. B. Weinberg. I. A. Clark et al.** 2006 Decreased circulating macrophage migration inhibitory factor (MIF) protein and blood mononuclear cell MIF transcripts in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Immunol.* **119**: 219-225.
- [10] **McDevitt A.M. J. Xie. G. Shanmugasundaram. J.Grifith. A. Liu. C. McDonald. P. Thuma et al.** 2006. A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. *J. Exp. Med.* **203**(5): 1185-1196.
- [11] **Flores M. R. Saavedra. R. Bautista. R. Viedma. E. P. Tenorio. L. Leng. Y. Sanchez et al.** 2008. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. *FASEB J.* **08**-111666: 1-11.
- [12] **Martiney A. J. B. Sherry. C. N. Metz. M. Espinoza. A. S. Ferrer. T. Calandra. H. E. Broxmerer et al.** 2000. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infect. Immun.* **68**(4): 2259-2267.
- [13] **Dewal J. R. Nagarkatti. W. Beatty. R. Angel. C. Slebodnick. J. Andersen. S. Kumar et al.** 2008. HDP- A novel heme detoxification protein from the malaria parasite. *PLoS pathog.* **4** (4) e1000053: 1-14.
- [14] **Badell E. C. Oeuvray A. Moreno S. Soe. N. V. Rooijen. A. Bouzidi et P. Druilhe.** 2000. Human malaria in immunocompromised Mice: An in vivo model to study defence mechanisms against *Plasmodium falciparum*. *J. Exp. Med.* **192** (11):1653-1660.
- [15] **Bolad A. et K. Berzins.** 2000. Antigenic diversity of *Plasmodium falciparum* and antibody-mediated parasite neutralisation. *Scand. J. Immunol.* **52**:233-239.

- [16] **Doolan D. L. et S. L. Hoffman.** 1997. Multi-gene vaccination against malarial: A multistage, multi-immune response approach. *Parasitol. Today*. **13**(5).
- [17] **Hisaeda H. K. Yasutomo et K. Himeno.** 2005. Malaria: immune evasion by parasites. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**: 700-706.
- [18] **Xu L. X. Pei. K. Berzins et A. Chaudhuri.** 2007. *Plasmodium yoelii*: Experimental evidences for the conserved epitopes between mouse and human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Exp. Parasitol.* **116**: 214-224.
- [19] **Le Bras J. L. Musset et J. Clain.** 2006. Les résistances aux médicaments antipaludiques. *Med. Mal. Infect.* **36**: 401-405.
- [20]. **Murphy C. S. T. Harrison. H. E. Hamm. J. W. Lomasney. N. Mohandas et K. Haldar.** 2006. Erythrocyte G Protein as a Novel Target for Malarial Chemotherapy. *PLoS Med* **3**(12): e528.
- [21] **Mota M. M. K. N. Brown V. E. D. Rosário, A. A. Holder et W. Jarra.** 2001. Antibody recognition of rodent malaria parasite antigens exposed at the infected erythrocyte surface: specificity of immunity generated in hyperimmune mice. *Infect. Immun.* **69**: 2535-2541.
- [22] **Cooper A. R. C. L. Hartwig et M. T. Ferdig.** 2005. pfcrt is more than the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance gene: a functional and evolutionary perspective. *Acta Trop.* **94**:170-180.
- [23] **Mercereau-Puijalon O.** Analyse moléculaire des infections par *Plasmodium falciparum* chez l'homme. 1999. *Trasfus. Clin. Biol.* **6** (1): 44-56.
- [24]. **Mota M. M. K. N. Brown. A. A. Holder et W. Jarra.** 1998. Acute *Plasmodium chabaudi chabaudi* malaria infection induces antibodies which bind to the surfaces of parasitized erythrocytes and promote their phagocytosis by macrophage in vivo. *Infect. Immun.* **66**: 4080-4086.
- [25] **Perlmann P. et M. Troye Blomberg.** 2002. Malaria and the immune system in humans. *Chem. Immunol.* **80**: 229-242.

- [26] **Taylor-Robinson A. W.** 1995. Regulation of immunity to malaria: Valuable lessons learned from murine models. *Parasitol. Today*. **11**(9): 334-342.
- [27] **Black G. C. L. Wang. A. R. Hibbs. E. Werner et R. L. Coppel.** 1999. Identification of the *Plasmodium chabaudi* homologue of merozoite surface proteins 4 and 5 of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* **67**(5): 2057-2081.
- [28] **Wykes N. M. X. Q. Liu. L. Beattie. D. Stanisic. K. J. Stacey. M. J. Smyth. R. Thornas et M. F. Good.** 2007. *Plasmodium* strain determines dendritic cell function essential for survival from malaria. *PLoS Patho.* **3**(7): e96. doi:10.1371/journal.ppat.0030096.
- [29] **Leirião P. S. S. Albuquerque. S. Corso. G.-J. Van Gemert. R. W. Sauerwein. A. Rodriguez. S. Giordano et al.** 2005. HGF/MET signalling protects *Plasmodium* infected host cells from apoptosis. *Cell. Microbiol.* **7**(4): 603-609.
- [30] **Xiao G-H. M. Jeffers. A. Bellacosa. Y. Mitsuuchi. G. f. Vande Woude et J. R. Testa.** 2001. Anti-apoptotic signalling by hepatocyte growth factory/Met via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**(1): 247-252.
- [31] **Menard R.** 2006. Malaria: parasite imaging unveils the intimacy of infection. *Pathol. Biol.* **55**: 219-222.
- [32] **Engwerda R. C. L. Beattie et F. H. Amante.** 2005. The importance of the spleen in malaria. *Trends Parasitol.* **21**(2): 75-80.
- [33] **Yadava A. S. Kumar. J. A. Dvorak. G. Milon et H. Miller.** 1996. Traffincking of *plasmodium chabaudi adami*-infected erythrocytes within the mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 4595-4599.
- [34] **Couper N. K. D. G. Blount. J. C. R. Hafalla. N. Van Rooijen. J. B. De Souza et E. M. Riley.** 2007. Macrophage-mediated but gamma interferon-independent innate immune responses control the primary wave of *Plasmodium yoelii* parasitemia. *Infect. Immun.* **75** (12):5806–5818.

- [35] **Roetynck S. M. Baratin. E. Vivier et S. Ugolini.** 2006. Cellules natural killer et immunité innée contre le paludisme. *Med Sci.* **22**: 639-644.
- [36] **Roland J. V. Soulard. C. Le Sellier. A.-M. Drapier. J. P. Di Santo. P.-A. Cazenave et S. Pied.** 2006. NK cell responses to Plasmodium infection and control of intrahepatic parasite development. *J. Parasitol.* **177**: 1229-1239.
- [37] **Korbel S. D. O. C. Finney et E. M. Riley.** 2003. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int. J. Parasitol.* **34**: 1517-1528.
- [38] **Hansen S. D. M. C D’Ombrain et L. Schofield.** 2007. The role of leukocytes bearing Natural Killer Complex receptors and Killer Immunoglobulin-like Receptors in the immunology of malaria. *Curr. Opin. Immunol.* **19**: 416-423.
- [39] **Gongora C. et N. Mechti.** 1999. L’interféron: un mécanisme complexe de signalisation. *Bull. Cancer.* **86** (11): 911-920.
- [40] **Parham P. et P. L. Masson.** 2003. Le système immunitaire. *Publication De Boeck Université.* 424 pages.
- [41] **Pelicano L. K. Mouinira et A. Chelbi.** 1998. L’interféron et l’acide rétinoïque dans le traitement des cancers humains: mécanisme d’action. *Bull. Cancer.* **85**(4): 313-318.
- [42] **Chizzolini C. G. E. Graut. A. Geinoz et D. Schrijvers.** 1990. T lymphocyte interferon-gamma production induced by Plasmodium falciparum antigen is high in recently infected non-immune and low in immune subjects. *Clin. Exp. Immunol.* **79**: 95-99.
- [43] **Stevens A. et J. Lowe.** 1997. Histologie humaine. *De Boeck Université.* 416.
- [44] **Noël W. G. Raes. G. H. Ghassabeh. P. De Baetselier et A. Beschin.** 2004. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol.* **20**(3): 126-133.
- [45] **P’ng L. M. G. Nair. J. Parkinson. D. Guiliano. M. Blaxter et J. E. Allen.** 2002. IL-4 dependente alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol.* **3**(7): 1-11.

- [46] **Goerdts S. et C. E. Orfanos.** 1999. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity*. **10**: 137-142.
- [47] **Brown J. B. M. Greenwood et R. J. Terry.** 1986. Cellular mechanisms involved in recovery from acute malaria in Gambian children. *Parasite. Immunol.* **8**: 551-564.
- [48] **Munder M. K. Eichmann et M. Modolell.** 1998. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the Nitric Oxide Synthase/Arginase balance: competitive regulation by CD41 T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J. Immunol.* **160**: 5347-5354.
- [49] **Dondorp A. M. P. A. Kager. J. Vreeken et N. J. White.** 2000. Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. *Parasitol. Today*. **16**: 228-32.
- [50] **Srivastava S. D. L. Bhara. J. Cai. S. Sharma. H. E. Hurst. A. Bhatnagar et S. K. Srivastava.** 2000. Metabolism of lipid peroxidation product, 4-Hydroxynonenal (HNE) in rat erythrocytes: role of aldose reductase. *Free Radic. Biol. Med.* **29**(7): 642-651.
- [51] **Giribaldi G. D. Ulliers. E. Schwarzer. I. Roberts, W. Piacibello et P. Arese.** 2004. Hemozoin and 4-hydroxynonenal-mediated inhibition of erythropoiesis. Possible role in malarial dyserythropoiesis and anemia. *Haematologica*. **89**(4):492-493.
- [52] **Latger-Cannard V. B. Bibes. A. Dao. A. Fohlen-Walter. J. Buisine. C. Rabaud. T. May et al.** 2002. Infection à Plasmodium et cytopénie. *Ann. Biol. Clin.* **60**(2): 213-219.
- [53] **Urban C. B. et D. J. Roberts.** 2002. Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells. *Curr. Opin. Immunol.* **14**: 458-465.

- [54] **Schwarze E. M. Alessio. D. Ulliers et Paolo Arese.** 1998. Phagocytosis of the malarial pigment, hemozoin impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54 ET CD 11c in human monocytes. *Infect. Immun.* 66 (4): 1601-1606.
- [55] **Jaramillo M. M. Godbout et M. Olivier.** 2005. Induces Chemokine Expression through Oxidative Stress-Dependent and -Independent Mechanisms. *J. Immunol.* 174: 475-484.
- [56] **Carney K. C. A. C. Schrimpe. K. Halfpenny. R. S. Harry. C. M. Miller. M. Broncel. S. L. Sewell. J. E. Schaff et al.** 2006. The basis of the immunomodulatory activity of malaria pigment (hemozoin). *J. Biol. Inorg. Chem.* 11: 917-929.
- [57] **Keller C. C. O. Yamo. C. Ouma. J. M. Ong'echa. D. Ounah. J. B. Hittner. J. M. Vulule et al.** 2006. Acquisition of hemozoin by monocytes down-regulates interleukin-12 p40 (IL-12P40) transcripts and circulating IL-12p70 through an IL-10-dependent mechanism: In vivo and in vitro findings in severe malarial anemia. *Infect. Immun.* 74 (9): 5249-5260.
- [58] **Maillet M. M. Lemullos.** 2006. Biologie cellulaire. *Elsevier Masson*. P618.
- [59] **Taylor-Robinson W. A.** 1998. Immunoregulation of malarial infection: balancing the vices and virtues. *Int. J. Parasitol.* 28: 135-148.
- [60] **Venturini G. M. Colasanti. L. Salvati. L. Gradoni et P. Ascenzi.** 2000. Nitric Oxide Inhibits Falcipain, the *Plasmodium falciparum* Trophozoite Cysteine Protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267:190-193.
- [61] **Rockett A. K. M. M. Awburn. E. J. Rockett. W. B. Cowden et I. A. Clark.** 1994. Possible rôle of nitric oxide in malaria immunosuppression. *Parasite Immunol.* 16: 243-249
- [62] **Van der Heyde C. H. Y. Gu. Q. Zhang. G. Sun et M. B. Grisham.** 2000. Nitric oxide is neither necessary nor sufficient for resolution of *Plasmodium chabaudi* malaria in mice. *J. Immunol.* 165: 3317-3323.

- [63] **Liew. Y. F.** 1995. Regulation of lymphocyte functions by nitric oxide. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 396-399.
- [64] **Touzé J.-E. F. Simon. P. Hovette. F. Peyron. M. Le Bras. R. Laroche.** 1991. Le TNF- α en pathologie infectieuse: place et perspectives. *Cah. Santé.* 1: 357-360.
- [65] **Rahman M. M. et G. McFadden.** 2006. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog.* 2 (2) e4: 66-75.
- [66] **Tsao. T. C. Y. L. Li. M. Hsieh. S. Liao et K. S. S. Chang.** 1999. Soluble TNF- α receptor and IL-1 receptor antagonist elevation in BAL in active pulmonary TB. *Eur. Respir. J.* 14: 490-495.
- [67] **Randa A. K. M. H. I. El-Gendi et H. Ahmed.** 2005. Serum neopterin, tumor necrosis factor- α and soluble tumor necrosis factor receptor II (p75) levels and disease activity in Egyptian female patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Biochem.* 38: 134– 141.
- [68] **MacEwan D. J.** 2002. TNF ligands and receptors \pm a matter of life and death. *Br. J. Pharmacol.* 135: 855-875.
- [69] **Micheau O.** 2004. To die or not to die? Un modèle de la signalisation dichotomique de TNF-R1. *Med Sci.* 20 (2): 153-155.
- [70] **Tracey J. K. et A. Cerami.** 1989. Studies of cachexia in parasitic infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 211-218.
- [71] **Sansanee C. C. A. S. M. Rutta. K. Muenthaisong. P. Watkins. M. Na Ubol et S. Looareesuwan.** 2004. Reduced levels of transforming growth factor- α , interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with malaria. *Acta. Trop.* 89: 319-327.
- [72] **Stevenson M. M. Z. Su. H. Sam et K. Mohan.** 2001. Modulation of host responses to blood-stage malaria by interleukin-12: from therapy to adjuvant activity. *Microbes Infect.* 49-59.

- [73] **Takayuki Y. C.-R. Wang. T. Yoneto. S. Waki. S. Sunaga. Y. Komagata. M. Mitsuyama et al**, 1998. Reduced T helper1 responses in IL-12 p40 transgenic mice. *J. Immunol.* **160**: 588-594.
- [74] **Trinchieri. G.** 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptative immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 133-146.
- [75] **Kubata K. N. Eguchi. Y. Urade. K. Yamashita. T. Mitamura. K. Tai. O. Hayaishi et al**, 1998. *Plasmodium falciparum* Produces Prostaglandins that are Pyrogenic, Somnogenic, and Immunosuppressive Substances in Humans. *J. Exp. Med.* **188** (6): 1197–1202.
- [76] **Elliott R. S. T. P. Spurck. J. M. Dodin. A. G. Maier. T. S. Voss. F. Yosaatmadjan. P. D. Payne et al.** 2007. Inhibition of dendritic cell maturation by malaria is dose dependent and does not require *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Infect. Immun.* **75** (7): 3621-3632.
- [77] **Malaguarnera L. R. M. Imbesi. S. Pignatelli. J. Simporè. M. Malaguarnera et S. Musumeci.** 2002. Increased level of interleukin-12 in *plasmodium falciparum* malaria: correlation with the severity of disease. *Parasite. Immunol.* **24**: 387-389.
- [78] **Imler J.-L.** 2004. Immunité innée et récepteurs tolls. *Flammarion Médecine-Sciences — Actualités Néphrologiques.* **P** 1-9.
- [79] **Langhorne J. F. M. Ndungu. A. M. Sponaas et K. Marsh.** 2008. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat. Immunol.* **9** (7): 725-732.
- [80] **Chatenoud L.** 2002. Immunité innée et immunité adaptative: un flirt bénéfique? *Méd. Sci.* **18**(12): 1183-1184.
- [81] **Aidoo M. et V. Udhayakumar.** 2000. Field studies of cytotoxic T lymphocytes in malaria infections: implications for malaria vaccine development. *Parasitol. Today.* **16** (2): 50-56.
- [82] **Smyth J. M. et J. A. Trapani.** 1993. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol. Today.* **16** (4): 202-206.

- [83] **Podoba E. J. et M. M. Stevenson.** 1991. CD4+ and CD8+ T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect. Immun.* **59**(1): 51-58.
- [84] **Kidd P.** 2003. Th1/Th2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* **8**(3): 223-246.
- [85] **Stevcnson M. M. et M. F. Tam.** 1993. Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage *Plasmodium chabaudi* (AS) infection in resistant and susceptible mice. *Clin. Exp. Immunol.* **92**: 77-83.
- [86] **Peterson D. J. L. A. Herzenberg. K. Vasquez et C. Walterbaugh.** 1998. Gluthathione levels in antigen- presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc. Natl. Sci. USA.* **95**: 3071-3076.
- [87] **Sun J. M. Walsh. A. V. Villarino. L. Cervi. C. A. Hunter. Y. Choi et E. J. Pearce.** 2005. TLR ligands can activate dendritic cells to provide a MyD88-dependent negative signal for Th2 cell development. *J. Immunol.* **174**: 742-751.
- [88] **Perry A. J., C. S. Olvers, R. C. Burnett et A. C. Avery.** 2005. The Acquisition of TLR tolerance during malaria infection impacts T cell activation. *J. Immunol.* **174**: 5921-5925.
- [89] **Taylor-Robinson W. A. et R. S. Phillips.** 1992. Functional characterization of protective CD4+ T-cell clones reactivities to the murine malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Immunology.* **77**: 99-105
- [90] **Huet O. G. Choukroun et J.-P. Mira.** 2004. Récepteurs de type Toll, réponse inflammatoire et sepsis Toll like receptor, inflammatory response and sepsis. *Réanim.* **13**: 167-175.
- [91] **MacLeod H et L. M. Wetzler,** 2007. T cell activation by TLRs: A role for TLRs in the adaptive immune response. *Perspective.* **402**(pe48): 1-2.
- [92] **Ropert C. B. S. Franklin et R. T. Gazzinelli.** 2007. Role of TLRs/MyD88 in host resistance and pathogenesis during protozoan infection: lessons from malaria. *Semin. Immunopathol.* **30**: 41-51.

- [93] **Komai-Koma M. L. Jones. G. S. Ogg. D. Xu et F. Y. Liew.** 2004. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(9): 3029-3034.
- [94] **Gelman E. A. J. Zhang. Y. Choi et L. A. Turka.** 2004. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4 T cell survival. *J. Immunol.* **172**: 6065-6073.
- [95] **Imanishi T. H. Hara. S. Suzuki. N. Suzuki S. Akira et T. Saito.** 2007. Cutting Edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J. Immunol.* **178**: 6715–6719.
- [96] **Abdollahi-Roodsaz. S. L. A. B. Joosten. M. I. Koenders. I. Devesa. M. F. Roelofs. T. R. D. J. Radstake. M. Heuvelmans-Jacobs et al.** 2008. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J. Clin. Invest.* **118**: 205–216.
- [97] **Dillon S. A. Agrawal. T. Van Dyke. G. Landreth. L. McCauley. A. Koh C. Maliszewski et al.** 2004. A Toll-Like Receptor 2 Ligand Stimulates Th2 Responses In Vivo, via Induction of Extracellular Signal-Regulated Kinase Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Fos in Dendritic Cells. *J. Immunol.* **172**: 4733–4743.
- [98] **Adachi K. H. Tsutsui. S.-I. Kashiwamura. E. Seki. H. Nakano. O. Takeuchi K. Takeda. K. Okumura et al.** 2001. *Plasmodium berghei* Infection in Mice Induces Liver Injury by an IL-12- and Toll-Like Receptor/Myeloid Differentiation Factor 88-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* **167**: 5928–5934.
- [99] **Loharungsikul S. M. Troye-Blomberg. P. Amoudruz. S. Pichyangkul. K. Yongvanitchit. S. Looareesuwan. Y. Mahakunkijcharoen et al.** 2008. Expression of Toll-like receptors on antigen-presenting cells in patients with falciparum malaria. *Acta. Trop.* **105**: 10-15.
- [100] **Gowda D. C.** 2007. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol.* **23** (12): 596-604.
- [101] **Lue. H. R. Kleemann. T. Calandra. T. Roger. J. Bernhagen.** 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect.* **4**: 449-460.

- [102] **Leng L. C. N. Metz. Y. Fang. J. Xu. S. Donnelly. J. Baugh. T. Delohery et al.** 2003. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.* **197**(11): 1467-1476.
- [103] **Baumann R. C. Casaulta. D. Simon. S. Conus. S. Yousefi et H. U. Simon.** 2003. Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *FASEB J.* **17**: 2221-2230.
- [104] **Larson F. D. et K. Horak.** 2006. Commentary. Macrophage migration inhibitory factor: controller of systemic inflammation. *Crit. Care.* **10**:138 (doi: 10.1186/cc4899).
- [105] **Mizue Y. S. Ghani. L. Leng. C. McDonald. P. Kong. J. Baugh. S. J. Lane et al.** 2005. Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**(40): 14410-14415.
- [106] **Chesney J. C. Metz. M. Bacher. T. Peng. A. Meinhardt et R. Bucala.** 1997. An Essential Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Angiogenesis and the Growth of a Murine Lymphoma. *Mol. Med.* **5**: 181-191.
- [107] **Flaster H. J. Bernhagen. T. Calandra et R. Bucala.** 2007. The Macrophage Migration Inhibitory Factor- Glucocorticoid Dyad: Regulation of Inflammation and Immunity. *Mol. Endocrinol.* **21**(6):1267–1280.
- [108] **Bélanger Benoît.** 2008. La neutralisation du facteur d'inhibition de migration des macrophages (MIF) augmente la sécrétion du TNF- α et module la sécrétion d'IFN- α durant l'infection par *Plasmodium chabaudi adami*. Mémoire de fin d'études, département de Sciences biologiques, Université du Québec à Montréal.
- [109] **Namazi J. M. et R. S. Phillips.** 2010. Immune responses of NIH mice infected with avirulent and virulent strains of *Plasmodium chabaudi adami* single and mixed infections. *Korean J Parasitol.* **48** (1): 23-33.
- [110] **Fraser T. S. J. Isern et M. H. Baron.** 2007. Maturation and enucleation of primitive erythroblasts during mouse embryogenesis is accompanied by changes in cell-surface antigen expression. *Blood.* **109** (1): 343-352.

- [111] **Chang K-H. M. M. Stevenson.** 2004. Malarial anaemia: mechanisms and implication of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Int. J. Parasitol.* **34**: 1501-1516.
- [112] **Calandra T. J. Bernhagen. R. A. Mitchell et R. Bucala.** 1994. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.* **179**: 1895-1902.
- [113] **Popa C. A. W.T. van Lieshout. M. F. Roelofs. A. Geurts-Moespot. P. L.C.M. van Riel. T. Calandra. F. C.G.J. Sweep et al.** 2005. MIF production by dendritic cells is differentially regulated by Toll-like receptors and increased during rheumatoid arthritis. *Cytokine.* **36**: 51-56.
- [114] **Caramalho I. T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury et J. Demengeot.** 2003. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **197** (4): 403-411.
- [115] **Gazzinelli T. R. et E. Y. Denkers.** 2006. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implication for host parasitism. *Nature.* **6**: 895-906.
- [116] **Franklin S. B. S. O. Rodrigues, L. R. Antonelli, R. V. Oliveira, A. M. Goncalves, P. A. Sales-Junior, E. P. Valente et al.** 2007. MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4⁺ T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. *Microbes infect.* **9**: 881-890.
- [117] **Taylor-Robinson W. A. et R. S. Phillips.** 1994. B Cells are required for the switch from Th1 to Th2-regulated immune responses to *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection. *Infect. Immun.* **62** (6): 2490-2498.
- [118] **Meding J. S. S. C. Cheng, B. Simon-Haarhaus et J. Langhorne.** 1990. Role of gamma interferon during infection with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Infect. Immun.* **58**(11): 3671-3678.
- [119] **Abe R. T. Peng, J. Sailors, R. Bucala et C. N. Metz.** 2001. Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor. *J. Immunol.* **166**: 747-753.

- [120] **Rodríguez-Sosa M. L. E. Rosas, J. R. David, R. Bojalil, A. R. Satoskar et L. I. Terrazas.** 2003. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect. Immun.* **71**(3): 1247-1254.
- [121] **Kaplan H.M. U. Schindler, S. T. Smiley et M. J. Grusby.** 1996. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 Cells. *Immunity.* **4**: 313-319.
- [122] **Wynn A. T.** Basophils trump dendritic cells as APCs for TH2 responses. 2009. *Nat Immunol.* **10**(7): 679–681.
- [123] **Elghazali G. H. Perlmann, A. S. Rutta, P. Perlmann et M. Troyen-Blomberg.** 1997. Elevated plasma levels of IgE in *Plasmodium falciparum*-primed individuals reflect an increased ratio of Il-4 to interferon-gamma (IFN- γ)-producing cells. *Clin. Exp. Immun.* **109**: 84-89.
- [124] **Othoro C. A. A. Lai, B. Nahlen, D. Koech, A. S. S. Orago et V. Udhayakumar.** 1999. A Low Interleukin-10 Tumor Necrosis Factor- α Ratio Is Associated with Malaria Anemia in Children Residing in a Holoendemic Malaria Region in Western Kenya. *J. Infect. Dis.* **179**(1): 279-282.
- [125] **Lan y. H. N. Yang, C. Metz, W. Mu, Q. Song, D. J. Nikolic-Paterson, M. Bacher et al.** 1997. TNF- α up-regulates renal MIF expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Mol. Med.* **3**(2): 136-144.
- [126] **Couper N. C. D. G. Blount et E. M. Riley.** 2008. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J. Immunol.* **180**: 5771-5777.
- [127] **Li C. I. Corraliza et J. Langhorne.** 1999. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Infect. Immun.* **67**(9): 4435-4442.
- [128] **Tamachi T. H. Takatori, M. Fujiwara, K. Hirose, Y. Maezawa, S.-I. Kagami, A. Suto et al.** 2009. STAT6 inhibits T-bet-independent Th1 cell differentiation. *Biochem. Biophys. Research Commun.* **382** 751–755

- [129] **Hwang E.S. S. J. Szabo, P. L. Schwartzberg et L. H. Glimcher.** 2005. T Helper Cell Fate Specified by Kinase-Mediated Interaction of T-bet with GATA-3. *Science*. **307**: 430.
- [130] **Usui T. J. C. Preiss, Y. Kanno, Z. J. Yao, J. H. Bream, J. J. O'Shea et W. Strober.** 2006. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on *IFNG* gene acetylation and transcription. *J. Exp. Med.* **203**(3): 755-766.
- [131] **Kurtzhals L .A. J. O. Rodrigues M. Addae J. O. O. Commey F. K. Nkrumah et L. Hviid.** 1997. Reversible suppression of bone marrow response to erythropoietin in *Plasmodium falciparum* malaria. *Br. J. Haematol.* **97**: 169-174.
- [132] **Chang K-H. M. Tam et M. M. Stevenson.** 2004. Inappropriately low reticulocytosis in severe malarial anemia correlates with suppression in the development of late erythroid precursors. *Blood*. **103** (10): 3727-3735.
- [133] **Lamb J. T. et J. Langhorne.** 2008. The severity of malarial anaemia in *Plasmodium chabaudi* infections of BALB/c mice is determined independently of the number of circulating parasites. *Malar. J.* **7**:68 doi:10.1186/1475-2875-7-68.
- [134] **Jarra W. K. N. Brown.** 1989. Invasion of mature and immature erythrocytes of CBA/Ca mice by a cloned line of *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Parasitology*. **99** (2):157-163.
- [135] **Coulon Séverine.** 2009. Rôle des Immunoglobulines A1 dans la régulation positive de l'érythropoïèse. THESE de doctorat, école doctorale de Cancérologie. Université Paris XI.
- [136] **Lenox E. L. J. M. Perry et R. F. Paulson.** 2005. BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood*. **105**: 2741-2748.
- [137] **Timms R. N. Colegrave. B. H. K. Chan et A. F. Read.** 2001. The effect of parasite dose on disease severity in the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Parasitology*. **123**: 1-11.

- [138] **Gowdahalli K. A. M. Hajjar. J. Zhu. E. J. Douglass. S. Uematsu. S. Akira. A. S. Woods et al.** 2005. Induction of Proinflammatory Responses in Macrophages by the Glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: Cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J. Biol. Chem.* **280**(9): 8606–8616.
- [139] **Gowda D.C.** 2007. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *TRENDS. Parasitol.* **23**(12): 596-604.
- [140] **Schofield L. et S. D. Tachado.** 1996. Regulation of host cell function by glycosylphosphatidylinositols of the parasitic protozoa. *Immunol. Cell. Biol.* **74**: 555-563.
- [141] **Chandrashekhar P. et R. Medzhitov.** 2004. Toll-Dependent Control Mechanisms of CD4 T Cell Activation. *Immunity.* **21**: 733–741.
- [142] **Babu S. C. P. Blauvelt, V. Kumaraswami et T. B. Nutman.** 2006. Cutting Edge: diminished T cell TLR expression and function modulates filarial infection the immune response in human *J. Immunol.* **176**: 3885-3889.
- [143] **Bernardo S. F. P. Parroche. M. A. Ataíde. F. Lauw. C. Ropert. R. B. D. E. Oliveira. D. Pereira et al.** 2009. Malaria primes the innate immune response due to interferon- γ induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106** (14): 5789–5794.